



**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON
MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA AGOMELATİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Semiha Nur ÖZKAYA
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Suat TEKİN**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA AGOMELATİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Semiha Nur ÖZKAYA

Fizyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Suat TEKİN

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-
2022-3072 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2024

KABUL VE ONAY SAYFASI



ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Suat TEKİN” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Agomelatinin Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 15/01/2024

Semiha Nur ÖZKAYA

İmza

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beynin Kanlanması	3
2.1.1. Willis Poligonu	4
2.2. İnme	6
2.2.1. Hemorajik İnme	8
2.2.2. İskemik İnme/Serebral İskemi	8
2.3. Agomelatin	15
2.3.1. Sentezi ve Kimyasal Yapısı	15
2.3.2. Fizyolojik Etkileri	16
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Deneyin Yapıldığı Merkez	20
3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi	20
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Tasarımı	20
3.4. Agomelatin ve HES Çözeltilerinin Hazırlanması	22
3.5. Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması	22
3.6. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri	25
3.7. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması	30
3.8. Analizlerin Yapılması	30
3.8.1. TTC Boyama ile Beyin İnfarkt Alanının Analizi	30
3.8.2. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik ve Otofajik Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.9. İstatistiksel Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1. Agomelatinin NDS ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi	34
4.1.1. Agomelatinin NDS Üzerine Etkisi	34

4.1.2. Agomelatinin Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi	35
4.1.3. Agomelatinin Yapışkan Çıkarma Süresi Üzerine Etkisi	36
4.1.4. Agomelatinin Kavrama Gücü Testi Üzerine Etkisi	37
4.2. Agomelatinin İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi	38
4.3. Agomelatinin Apoptotik ve Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	39
4.3.1. Agomelatinin Apoptotik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	39
4.3.2. Agomelatinin Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	41
5. TARTIŞMA.....	45
5.1. Agomelatinin Sİ/R Hasarında NDS, İnfarkt Alan ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi	45
5.2. Agomelatinin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi	46
5.2.1. Agomelatinin Apoptoz Üzerine Etkisi	46
5.2.2 Agomelatinin Otofaji Üzerine Etkisi	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR.....	51

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmama sağladığı maddi desteklerden ötürü İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2022-3072),

Tezimin ve yüksek lisans sürecimin tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Suat TEKİN ve ailesine, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a, Fizyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma, çalışmamdaki Western Blot analizinde destekleri için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK'e, çalışmamdaki deneyler ile tez yazımı sırasındaki katkılarından dolayı Dr. Furkan YÜKSEL, Tuba KESKİN, Güldeniz ŞEKERCİ, Öğr. Gör. Mehmet Refik BAHAR, Öğr. Gör. Samet ÖZ, Vet. Hek. Engin KORKMAZ ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen aileme,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Semiha Nur ÖZKAYA

ÖZET

Deneyisel Serebral İskemi/Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Agomelatinin Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada melatonergic ve serotonergic sistem aktivitesinde rol alan ve nörojenezi desteklediği bilinen Agomelatin'in, nöronlarda yoğun hasara neden olan Sİ/R sürecindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal Metod: Çalışmaya dahil edilen *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanlar kontrol, Sİ/R ve Sİ/R+Agomelatin (20 ve 40 mg/kg) olmak üzere dört gruba (n=10) ayrıldı. Kontrol dışındaki gruplarda 60 dakikalık Sİ uygulandı. Sİ'den bir saat sonra intraperitoneal yolla Sİ/R grubuna hidroksietil selüloz, Sİ/R+Agomelatin gruplarına ise 20 ve 40 mg/kg Agomelatin uygulandı. Üç günlük R boyunca sıçanlara NDS, rotarod, yapışkan çıkarma ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deney sonunda hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan, Western Blot yöntemi ile apoptoz (BCL-2 ve BAX) ve otofaji (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerinin seviyeleri belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapıldı.

Bulgular: Kontrol ve Sİ/R+Agomelatin gruplarının NDS skoru ve yapışkan çıkarma süresi, Sİ/R grubuna göre düşük; rotarodta kalma süresi ve kavrama gücü yüksekti ($p<0.05$). İnfarkt alanının Sİ/R grubunda, kontrol ve Sİ/R+Agomelatin gruplarına kıyasla büyük olduğu belirlendi ($p<0.05$). BCL-2, Beclin-1, ATG5 ve ATG7 protein seviyelerinin, Sİ/R+Agomelatin grubunda Sİ/R grubuna göre yüksek, BAX ve p62 protein seviyelerinin ise düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Sonuç: Agomelatin'in nörolojik defisit skorunu düşürdüğü görüldü. Davranış testlerinde de denge-motor koordinasyonu, somatosensör ve güç kaybını iyileştirdiği saptandı. İlaveten Agomelatin'in Sİ/R hasarının neden olduğu enfarktüs alanını azalttığı tespit edildi. Bunların yanı sıra apoptotik protein seviyelerinde apoptozu inhibe edecek yönde otofajik protein seviyelerinde otofajiyi indükleyecek yönde etkilediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Serebral İskemi, Agomelatin, Otofaji, Apoptoz

ABSTRACT

Investigation Of The Effects Of Agomelatin On Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Modeled Rats

Aim: In this study aimed to investigate the effects of Agomelatine, which plays a role in melatonergic and serotonergic system activity and is known to support neurogenesis, on the Cerebral Ischemia (CI)/Reperfusion (R) process, which causes intense damage to neurons.

Materials and Methods *Sprague Dawley* male rats included in the study were divided into four groups (n = 10): control, CI/R and CI/R+Agomelatine (20 and 40 mg/kg). In groups other than control, 60-minute CI was applied. One hour after SI, hydroxyethyl cellulose was administered intraperitoneally to the CI/R group, and 20 and 40 mg/kg Agomelatine was administered to the SI/R+Agomelatine groups. During three days of R, the rats were subjected to NDS, rotarod, adhesive removal and grip strength tests. At the end of the experiment, the animals were decapitated and their brain tissues were taken. In the brain tissues taken, the levels of infarct area were determined by TTC staining method, and the levels of apoptosis (BCL-2 and BAX) and autophagy (Beclin-1, ATG5, ATG7 and p62) proteins were determined by Western Blot method. Statistical analysis of the data obtained was performed.

Results: Control and Agomelatin groups than CI/R group, adhesive removal time and NDS score were lower; rotarod time and grip strength were higher ($p<0.05$). The infarct area was determined to be larger in the CI/R group compared to the control and SI/R+Agomelatine groups ($p<0.05$). BCL-2, Beclin-1, ATG5 and ATG7 protein levels were found to be higher in the SI/R+Agomelatine group compared to the CI/R group, and BAX and p62 protein levels were found to be lower ($p<0.05$).

Conclusion: Agomelatine was observed to reduce the neurological deficit score. In behavioral tests, it was determined that it improved balance-motor coordination, somatosensory and strength loss. Additionally, it was determined that Agomelatine reduced the infarct area caused by CI/R injury. In addition, it was determined that it affected the apoptotic protein levels in a way that would inhibit apoptosis and the autophagic protein levels in a way that would induce autophagy.

Keywords: Cerebral Ischemia, Agomelatine, Autophagy, Apoptosis

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5HT-2C	: 5-Hidroksitriptamin-2C
AKA	: Anterior Kommunikan Arter
ATP	: Adenozin tri-fosfat
BAX	: BCL-2 ile ilişkili X
BCL-2	: B hücreli lenfoma-2
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
EKA	: Eksternal Karotid Arter
GLUT1	: Glikoz taşıyıcı 1
GLUT3	: Glikoz taşıyıcı 3
İKA	: İnternal Karotid Arter
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KKA	: Kommon Karotid Arter
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MT1	: Melatonin Reseptörü Tip 1
MT2	: Melatonin Reseptörü Tip 2
NDS	: Nörolojik Defisit Skorlama
NMDA	: N-metil-D-aspartat
OSA	: Orta Serebral Arter
OSAO	: Orta Serebral Arter Oklüzyonu
R	: Reperfüzyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Sİ	: Serebral İskemi
TTC	: 2,3,5-trifenil tetrazolium klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2. 1. Glikozun kan beyin bariyerinden geçişi	3
Şekil 2. 2. Aortik ark ve Willis Poligonu'nun anatomik görünümü	5
Şekil 2. 3. İnsan ve sıçanlarda Willis Poligonu yapısı	6
Şekil 2. 4. Sİ'nin patofizyolojisi	12
Şekil 2. 5. Sİ'de apoptozun seyri	13
Şekil 2. 6. Sİ'de otofaji süreci	15
Şekil 2. 7. Agomelatin'in sentezi ve kimyasal yapısı	15
Şekil 2. 8. Agomelatinin sirkadiyen ritmin düzenlenmesindeki rolü	16
Şekil 2. 9. Agomelatin 5HT-2C reseptörüne antagonistik etkisi	17
Şekil 3. 1. Deney tasarımı	22
Şekil 3. 2. Deneysel Sİ/R modelinin şematik gösterimi	23
Şekil 3. 3. Deneysel Sİ modelinin oluşturulması	24
Şekil 3. 4. Sİ sürecinde rektal prob yardımıyla hayvanların vücut sıcaklıklarının korunması	25
Şekil 3. 5. Hayvanların nörolojik durumunun gözlemlenmesi	26
Şekil 3. 6. Rotarod cihazının ayarlanması ve hayvanların yerleştirilmesi	27
Şekil 3. 7. Hayvanlara rotarod testinin yapılması	27
Şekil 3. 8. Hayvanlara yapışkan çıkarma testinin yapılması	28
Şekil 3. 9. Hayvanlara kavrama gücü (grip strenght) testinin yapılması	29
Şekil 3. 10. İnfarkt alanın yüzdesel olarak hesaplanması	31
Şekil 3. 11. Western Blot analizine genel bakış	32
Şekil 3.10. Western Blot membran transferi için hazırlanan sandviçin yapısı	33
Şekil 4. 1. Agomelatinin NDS üzerine etkisi	34
Şekil 4. 2. Agomelatinin rotarod test süresi üzerine etkisi	35
Şekil 4. 3. Agomelatinin yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi	36
Şekil 4. 4. Agomelatinin kavrama gücü (grip strenght) testi ile hesaplanan sol pençe/sağ pençe kavrama gücü oranı üzerine etkisi	37
Şekil 4. 6. Agomelatinin BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi.	39
Şekil 4. 7. Agomelatinin BAX protein seviyesi üzerine etkisi.	40
Şekil 4. 8. Agomelatinin Beclin-1 seviyeleri üzerine etkisi.	41
Şekil 4. 9. Agomelatinin ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi.	42

Şekil 4. 10. Agomelatinin ATG7 protein seviyesi üzerine etkisi	43
Şekil 4. 11. Agomelatinin p62 protein seviyesi üzerine etkisi	45



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1: Bederson skörlama metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi	26
--	----



1. GİRİŞ

İnme, beyni besleyen damarlarda oluşan tıkanıklıklar ya da damar dışına kanamalar nedeniyle geçici/kalıcı olarak etkilenmesi ile karakterize nörolojik bir hastalıktır (1). Son yıllarda yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olması, insan sağlığına tehdidinin devam ettiğini göstermektedir (2). Ayrıca tüm dünyada önde gelen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer aldığı ve dünya çapındaki tüm ölümlerin %10'unu oluşturduğu bilinmektedir (3, 4). İnme temelde iskemik inme/serebral iskemi ve hemorajik inme olarak sınıflandırılabilir. Serebral İskemi (Sİ) tüm inmelerin yaklaşık %71'i gibi büyük bir kısmını oluşturmaktadır (5).

Sİ en başta duyuşal ve motor nöronların disfonksiyonu sonucu denge motor koordinasyonda bozukluklarla, somatosensoriyel kayıplarla ve kavrama gücünde zayıflamayla kendini gösterir (46). Fiziksel bu değişimin nedeni Sİ'nin yoğun nöronal hasara ve ölümüne neden olmasıdır (45) Sİ nedenli nöronal hasar beyni besleyen damar/damarların tıkanarak beyindeki kan akımının bölgesel veya tamamen kesilmesiyle başlar. Bu kesinti sonucu olarak oksijen ve glikoz yoksunluğu kaynaklı aşırı metabolik stres hali meydana gelir (6). Reperfüzyon (R) ise çeşitli mekanizmalar sonucu tıkanan kan akışının düzenlenmesi ile iskemik bölgenin yeniden oksijenlenmesi olayıdır. R'nin, Sİ nedenli aşırı metabolik stresi hafifletmesi, dolayısıyla doku hasarını azaltması beklenir. İlginç bir şekilde R sonrası oluşan doku hasarı sadece iskemi sonucunda oluşan doku hasarından fazladır. Yani Sİ'yi takip eden R'nin enfarktüs boyutunu arttırarak serebral hasarı şiddetlendirdiği görülür (7, 8). Buna “deklemp şoku (declamping shock)” adı verilir (9, 10). Sİ ve R hasarından en çok etkilenen bölge kor (çekirdek) ve bu bölgeyi çevreleyen alan ise penumbra alanı olarak adlandırılır (11). Kor bölgesinde daha kalıcı hasarlar ve nöronal ölümler meydana gelirken, perifere gidildikçe bu hasarın hafiflediği görülmüştür. Bu nedenle penumbra, potansiyel olarak kurtarılabilir bir alan olarak nitelendirilmiştir (12). Bu nitelik ile penumbra alanı, Sİ/R hasarı (13, 14) ve iyileşmesi (15-18) ile ilgili çalışmalar için bir hedef haline gelmiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda iskemik hasarın iyileşmesi sürecinde penumbradaki otofajik ve apoptotik aktivitenin önemli rol oynadığını göstermiştir.

Otofaji (Autóphagy), Yunancada *auto* (kendi) ve *phagein* (yemek) kelimelerinin birleşmesi ile oluşmuş ve kelime anlamı olarak “kendini yeme/sindirme” anlamına gelen bir terimdir. Bu terim ilk olarak Christian de Duve tarafından lizozomal aktiviteden bahsederken kullanılmıştır (19). Otofaji, sitoplazmik makromoleküller ve/veya işlevlerini

yitirmiş organellerin lizozom ile parçalanması olayıdır. Bu olay ile hücrenin ihtiyaç duyduğu enerji ve anabolik yapıtaşları sağlanır. Otofaji sadece hücrenel bileşenlerin dönüşümünden ibaret değildir. Stres ve “starvation” adı verilen hücrenel açlıkta otofajik aktivite artar.

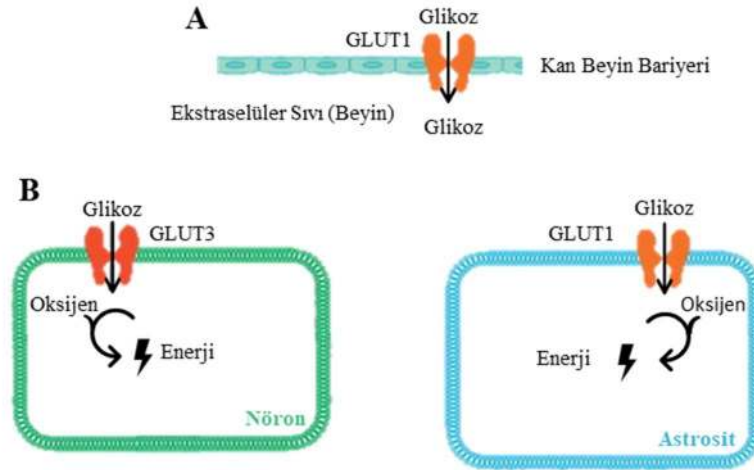
Apoptoz (Apóptosis), Yunanca *apó* (-den/-dan) ve *ptosis* (düşmek) anlamlarına gelen kelimelerden oluşmuş ve “ayrılarak düşme, son bulma” gibi anlamlarda kullanılmaktadır (20). Biyolojik terim olarak apoptoz, ilk olarak 1972’de Kerr ve arkadaşları tarafından, morfolojik olarak farklı bir biçimde olan ve programlanmış hücre ölümünü tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (20). Programlanmış hücre ölümü hücrenel döngüsünü tamamlamış hücrelerin ölümü ile organizmada hücre çoğalmasını düzenler. İlâveten, hasarlı ve potansiyel olarak tehlikeli hücrelerin yok edilmesiyle organizmaya bir savunma mekanizması sağlar. Tüm bunlar, beyinde ciddi bir doku hasarına neden olan Sİ’nin, beyin dokuda apoptotik aktivite artışına neden olabileceğini düşündürür (20).

Sİ/R hasarının iyileştirilmesine yönelik çeşitli yaklaşımlar mevcuttur (21-24). Bunlar arasında farmakolojik yaklaşımlar daha yaygındır. Bunun yanı sıra iskemik hasarın iyileştirilmesinde umut vadeden ajanlar ile ilgili çalışmalar devam etmiştir (25-28). Bu çalışmalarda Sİ/R hasarı ve Melatonin ile ilgili çalışmalar dikkat çekmiştir. Çünkü Melatonin’in immün yanıt oluşturulmasında (29, 30) ve antioksidan aktivitede (31-34) rol aldığı bilinmektedir. Merkezi sinir sisteminde (MSS) ise hem nöroprotektif (35, 36) hem de apoptotik ve otofajik aktivite ile nöroinflamasyonu hafifletici etkinliği (37, 38) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Tüm bunlar Melatonin agonisti olan Agomelatin’in de nöroprotektif ve/veya nöroinflamasyonu hafifletici etkinliği olabileceği beklentisi doğurmuştur. Yapılan çalışmalar bu beklentiyi karşılayacak niteliktedir (39-41). Bu durum, Agomelatin’in Sİ/R hasarı ile ilişkisinin inceleneceği çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Literatürde yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup genellikle Agomelatin’in Sİ/R hasarında nöroprotektif etkisi olabileceğini ortaya koymuştur (42-44). Buna karşın Agomelatin’in Sİ/R hasarında terapötik etkinliğinin olup olmadığı henüz tam anlamıyla aydınlatılmamıştır. Planlanan bu tez çalışmasında, Agomelatin’in Sİ/R hasarında tedavi edici etkinliği olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Planlanan bu tez çalışmasında, Agomelatin’in, Sİ/R hasarı nedenli denge-motor koordinasyonu, somatosensör ve güç kaybını iyileştirip iyileştirmeyeceğinin incelenmesi de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beynin Kanlanması

İnsan beyni, vücut ağırlığının %2-3'ü gibi küçük bir kısmını oluşturur. Buna karşın beyin istirahat halinde kalp debisinin yaklaşık olarak %15'i, oksijen ve enerji (glikoz) tüketiminin ise yaklaşık %20'si gibi büyük bir kısmına gereksinim duyar (45, 46). Beyin sinaps oluşturmak üzere nöronlar üzerinde aksonlar ve dendritlerin gelişimini sağlama, nörotransmitter sentezi ve depolanması, nöronal hasarın onarılması ve membran potansiyelinin korunması gibi sayısız işlevlere sahiptir. (47, 48). Bu sayısız işlevlerini gerçekleştirebilmesi için de enerjiye ihtiyaç duyar. Beynin temel enerji kaynağı glikozdur. Dolaşım ile beyne gelen glikoz, buradaki glikoz taşıyıcı 1 (GLUT1) aracılığıyla kan beyin bariyerini aşarak beyindeki ekstraselüler sıvıya geçer. Ekstraselüler sıvıdan da GLUT1 ile astrositlere ve GLUT3 adlı taşıyıcı ile de nöronlara girer. Glikoz, beyinde (perifer hücrelerde olduğu gibi) oksijen ile beraber yıkılarak enerjinin eldesinde kullanılır (49). Söz konusu işleyiş Şekil 2.1'de özetlenmiştir. Bu fizyolojik olay, beyin enerji gereksiniminin karşılanmasında glikoz ve oksijenin dolayısıyla tüm bunları sağlayan serebral kan akımının büyük önem taşıdığını gösterir.



Şekil 2. 1. Glikozun kan beyin bariyerinden geçişi ((A), glikozun nöron ve astrosit hücrelerine glikoz taşıyıcıları tarafından kullanılması (B)) (GLUT1: Glikoz taşıyıcı 1, GLUT3: Glikoz taşıyıcı 3)

Serebral kan akımı, 100 g beyin dokusunda dakikada yaklaşık 50 ml'dir. Bu değeri cevherde 70-80 ml/dakikaya çıkarken beyaz cevherde yaklaşık 20 ml/dakikadır (50, 51). Bununla beraber 100 g beyin dokusu dakikada yaklaşık 5,6 mg glikoz (49) ve 3,5 ml oksijen sarf eder. Serebral otoregülasyon bu hassas dengenin korunması için serebral arteriyel basıncı ortalama 70-160 mmHg aralığında tutar (50). Bu nedenle serebral kan akımı ve kan basıncı serebral otoregülasyon adı verilen mekanizma ile sürekli kontrol altında tutulur (52).

Serebral dolaşımda yer alan damarlar, brakiosefalik gövde (innominat arter), sol kommon karotid arter (KKA) ve sol subklavian arter olmak üzere 3 dala ayrılan aortik arktan köken alır. Innominat arter (brakiosefalik gövde) de Sağ KKA ve sağ subklavian arter olmak üzere iki dala ayrılır. Sağda ve solda seyreden KKA'lar internal karotid arter (İKA) ve eksternal karotid arter (EKA) olmak üzere dallara ayrılırlar ve bu dallardan İKA beyine ilerler. Yine sağda ve solda var olan subklavian arterlerden de vertebral arter adı verilen dallanmalar meydana gelir. Vertebral arterler beyine doğru kafatasının içerisinde birleşerek basiller arterleri oluşturur (51, 53).

Özetle periferden uzanarak beyine ulaşan ve serebral dolaşımda rol alan damarlar anteriorda İKA ve posteriorda basiller arterlerdir. Bu iki arter beyin içinde kompleks bir damar ağı olan Willis Poligonu'nu oluşturur.

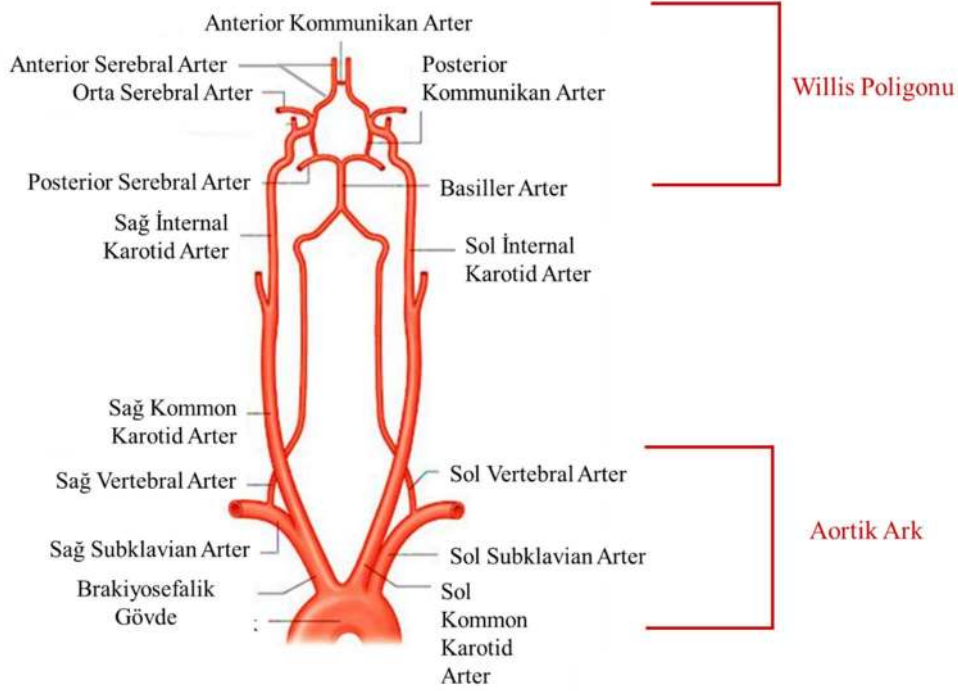
2.1.1. Willis Poligonu

Willis Poligonu, beynin tabanına yerleşik anastomoz yapmış arterlerden oluşan damarsal ağıdır. Bu damarsal yapı ve işlevi tarihte Fallopius, Casserio, Vesling ve Webfer gibi birçok bilim insanı tarafından aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak 1664'te Thomas Willis'in tam tanımlaması ve işlevini ortaya koyması ile bu yapıya Willis Poligonu adı verilmiştir (54, 55).

Poligon (*polygone*) Fransızca kökenli bir kelime olup "çokgen" anlamındadır ve gerçekten de Willis Poligonunda yer alan atardamarlar çokgeni anımsatacak görünümündedir. Anastomoz yapmış damarların bağlantısının ifadesinde poligon kavramının yanı sıra çember kavramı da kullanılabilir. Çünkü anastomotik damarlar beyindeki kanlanmanın aksamaması için çembersel bağlantı kurmuşlardır. Bu bağlantı sayesinde beyindeki kan akışının azalması veya durması halinde beyin dokusunda perfüzyon korunur (56). Yani Willis Poligonu'nun temel işlevi serebral

kanlanmanın kusursuz sağlanmasıdır. Bu işlevini nasıl gerçekleştirdiğinin tam anlaşılabilmesi için Willis Poligonu'nu oluşturan arterlerin iyi bilinmesi gerekir.

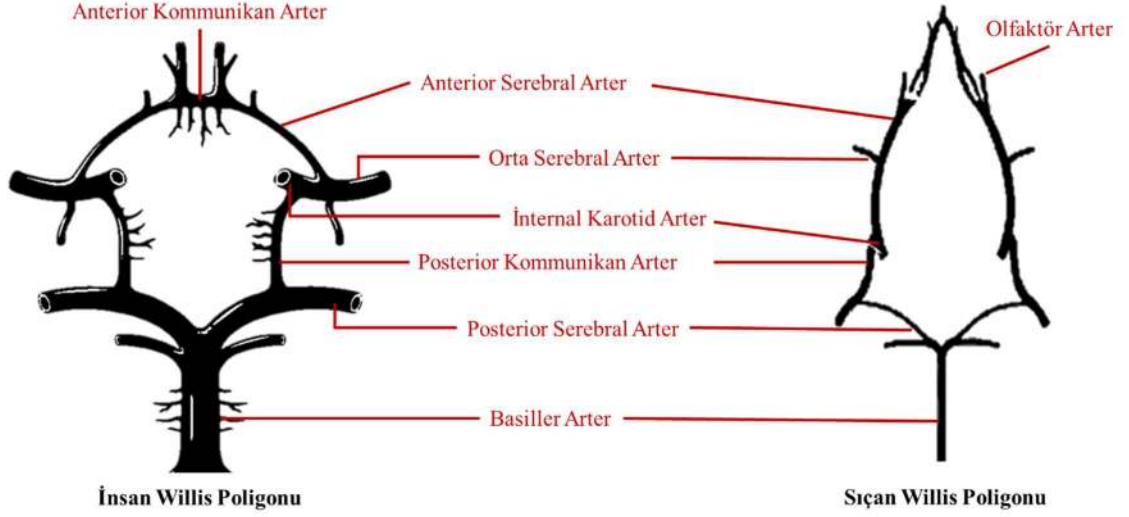
Willis Poligonu basitçe İKA'nın ve basiller arterin dallarından oluşan bir vasküler halkadır. Karşılıklı İKA'lardan bilateral olarak dallanan anterior serebral arterler, anterior kommunikan arter (AKA) ile birbirine bağlanarak beynin ön tarafının kanlanmasını sağlar. İKA'dan dallanan orta serebral arterler (OSA) beynin laterale doğru seyrederek bu bölgelerin kanlanmasını sağlar. Beynin arka tarafı ise Basiller arterin, ikisi de posterior serebral arter olarak adlandırılan iki dalı ile kanlanır. Bu dallar posterior kommunikan arterler ile İKA'ya bağlanır. Böylece çember tamamlanarak beynin her bölgesinin kesintisiz kanlanması sağlanır (57). Serebral dolaşımda ve Willis Poligonu'nda yer alan damarlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. Aortik ark ve Willis Poligonu'nun anatomik görünümü (58)

Sıçan ve insan Willis Poligonu, büyük ölçüde benzer olsa da serebral halkada morfolojik farklılıklar mevcuttur (Şekil 2.3). İnsan Willis Poligonundaki AKA sıçanlarda bulunmamakta, sıçanlardaki olfaktör arterler de insan Willis Poligonunda yer

almamaktadır. Sıçanlarda İKA'ların Willis Poligonu'na katılması dikkat çekmektedir. Bunun aksine insanlarda İKA'lar Willis poligonuna dahil olmadan dallanır (59).



Şekil 2. 3. İnsan ve sıçanlarda Willis Poligonu yapısı (60)

2.2. İnme

Halk arasında felç olarak da bilinen inme, serebral kan akışının azalması veya kesilmesi sonucu beynin glikoz ve oksijenden yoksun kalması ile ortaya çıkan klinik tablo olarak tanımlanabilir (61, 62). Dünya Sağlık Örgütü inmeyi vasküler nedenli serebral fonksiyon bozukluğu olarak tanımlamış ve inmenin genellikle 24 saatten fazla sürerek ölümle sonuçlandığını belirtmiştir (63, 64).

İnmenin tarihi MÖ 1600'lü yıllara dayanmaktadır. Eski mısır tıbbi metinlerinden Edwin Smith Papirüsü'nde ilk kez travmatik beyin hasarından bahsedilmiştir (65). MÖ 400'lü yıllara gelindiğinde antik Yunan hekimlerinden Hipokrat ise inmeye benzer bir durumdan bahsetmiş ve bu durumu "apopleksi" olarak adlandırmıştır (66, 67). On yedinci yüzyıla gelindiğinde İngiliz hekim Thomas Willis inmeyi kan dolaşımı ve akışındaki bozulma nedeniyle meydana gelen beyin hastalığı olarak tanımlamıştır (68). On dokuzuncu yüzyılda Fransız doktor Jean-Martin Charcot, Hipokrat'ın yüzyıllar önce apopleksi olarak adlandırdığı terimi ani felç ve bilinç kaybı olarak tanıttı ve bu duruma serebral damarlarda biriken kolesterolün damarı tıkaması ile veya damarda oluşan pıhtı

ile beyne giden kanın azalmasının ve kesilmesinin neden olduğunu vurguladı (69, 70). Yirminci yüzyıl başlarında X-ışınları ve daha sonra bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi çeşitli görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesi tıp dünyasını aydınlatır nitelikte olmuştur (71). Teknolojik gelişmeler ile beyinde gerçekleşen bu olay ve hasarın boyutu daha net belirlenebilmiş ve serebral kan akışındaki değişiklikler daha iyi incelenebilmiştir. İncelemeler doğrultusunda yapılan çalışmalar serebral kan akışındaki azalmanın veya kesintinin nedeni olarak beyne giden damarlarda pıhtılaşmayı öne çıkarmıştır (72, 73). Elde edilen bu sonuçlar üzerine yirminci yüzyılın sonlarına doğru yapılan bilimsel çalışmalar inmenin önlenmesi ve tedavisine yönelmiştir. Bu bağlamda pıhtılaşmanın önüne geçebilmek için heparin ve varfarin başta olmak üzere çeşitli antikoagülanlar (74, 75) mevcut pıhtının çözülmesi için ise çeşitli trombolitik tedaviler (76, 77) geliştirilmiştir. Yirmi birinci yüzyıla gelindiğinde ise endovasküler trombektomi adı verilen beyindeki kan pıhtısının fiziksel olarak alınmasını sağlayabilecek stentler ve kateterler geliştirilmiştir (78, 79).

Tarih boyunca inmenin bu kadar ilgiyle takip edilmesinin nedeni mortalite ve morbidite oranları yüksek bir hastalık olmasıdır (2, 80). Dünya genelinde, başlıca ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alması (3) ve tüm ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturması (4) bu hastalığın ciddiyetini göstermektedir.

2019 ve 2022'de yapılan Global İnme İstatistiklerinde inme vakalarının, inme nedenli ölümlerin, inmenin görüldüğü cinsiyet ve yaş grubunun ülkelere göre değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir. İstatistik sonuçlarına bakıldığında üç yıl içerisinde inme mortalite oranının azaldığı (81, 82) farklı bir çalışmada da bu azalmanın çeşitli tedavilere bağlı seyrettiği ortaya konmuştur (2, 80).

İnme, hemorajik inme ve iskemik inme/serebral iskemi olarak adlandırılan iki şekilde görülebilir. Sİ tüm inmelerin yaklaşık %71'i gibi büyük bir kısmını, hemorajik inme ise yaklaşık %29'unu oluşturmaktadır (5).

İskemik inme, hemorajik inme ile benzer seyreder. İkisi de serebral kanlanmanın azalması/kesintiye uğraması sonucu beynin glikoz ve oksijenden yoksun kalarak hasarlanması şeklinde ilerler. İkisi arasında bilinen tek fark serebral kanlanmanın nasıl kesintiye uğradığıdır (83). Bu iki inme türünün daha iyi anlaşılabilmesi için daha yakından incelenmesi gerekir.

2.2.1. Hemorajik İnme

Hemorajik inme beyne giden kan damarlarının zarar görmesi ve/veya yırtılması sonucu meydana gelen beyin kanaması olarak tanımlanabilir. Beyinde gerçekleşen bu kanama sonucunda hem damarlardan sızan kan beyin dokusuna baskı yapar hem de serebral kan akışı kesintiye uğrar. Bu iki durum da beyin dokusunda hasara neden olur (84). Hemorajik inme, intraserebral kanama ve subaraknoid kanama adı verilen iki tür olarak görülebilir (85). Bu iki kanama türü arasından intraserebral kanamanın daha yaygın olduğu bilinmekle birlikte ileri yaşlarda ve erkeklerde daha sık görülmektedir (86, 87).

2.2.2. İskemik İnme/Serebral İskemi

İskemik inme, serebral damarların tıkanması sonucu meydana gelen inme türüdür. Beyne giden damarların tıkanması sonucu serebral kanlanmanın azalması ve/veya kesintiye uğraması ile gerçekleşir. Damar tıkanıklığının en yaygın nedenleri kan damarlarının duvarlarında plak oluşumu ve kanın damar içerisinde pıhtılaşarak tromboz veya emboli oluşumudur (88). Bu plakların oluşumu, kanda bulunan kolesterol, trigliserit ve diğer maddelerin (kalsiyum, hücrel atıklar vb.) vasküler duvarlarda birikmesiyle şekillenmektedir. Damar duvarlarındaki hasar sonucu kanda bulunan pıhtılaşma faktörlerinin etkisiyle tromboz meydana gelir. Tromboz da damar çeperine yapışarak pıhtı veya emboli oluşumuna neden olur (88).

A. Tarihi ve Tanımlanması

Sİ'nin klinik bulgularının incelenmesi inme semptomlarının ilk kez tanımlandığı dönemlere kadar uzanır. On dokuzuncu yüzyıla gelindiğinde ise Fransız Doktor Jean-Martin Charcot, Hipokrat'ın yüzyıllar önce apopleksi olarak adlandırdığı inmeyi açıklaması Sİ'ye özgü ilk bulguları ortaya koymuştur. Dr. Charcot, inmenin beyin damarlarında tıkanma sonucu kanlanmanın azalmasıyla meydana geldiğini açıklamış, beyin damarlarındaki tıkanıklığa damar çeperinde kolesterol birikmesinin veya damarlarda oluşabilen pıhtının neden olduğunu ortaya koymuştur (69, 70). On dokuzuncu yüzyıl ortalarında kalp hastalarını incelerken sadece serebral damarlardaki pıhtılaşmanın değil perifer damarlarda oluşan pıhtının da dolaşım yoluyla beyin damarlarını tıkayabileceğini fark eden Fransız doktor Armand Trousseau serebral emboli ve inme arasındaki bağlantıyı açıklamıştır (89). Yirminci yüzyıla gelindiğinde, günümüzde hala kullanılmakta olan serebral anjiyografi ve elektroensefalografi gibi teşhis tekniklerinin geliştirilmesi Sİ'nin tanımlanmasına büyük katkı sağlamıştır (90, 91). Bu gelişmelere

bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi görüntüleme yöntemlerinin de eklenmesi Sİ'nin teşhisinde büyük kolaylık sağlamıştır (71, 92). Teşhis kolaylığı sağlanmasıyla iskemik inmenin altında yatan nedenlerinden biri olan serebral tromboz ve emboliyi daha iyi aydınlatır nitelikte olmuştur (93, 94).

B. Epidemiyolojisi

Sİ tüm inmelerin yaklaşık %71'i gibi büyük bir kısmını oluşturduğu bilinmektedir (5). Yapılan bazı istatistiksel çalışmalar bu payın %85'e varabileceğini ortaya koymuştur (95). Sİ insidansının yaşla beraber arttığı ve 65 yaş üzerinde yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. Cinsiyete göre dağılımına bakıldığında erkeklerdeki oranın kadınlardakinden daha yüksek olduğu buna karşın kadınların hayat boyu Sİ riskinin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir (96). Kadınlardaki bu yüksek riskin nedeni Sİ'ye karşı koruyucu olduğu ifade edilen premenopozal dönemdeki hormonal faktörlerin menopoz döneminde ortadan kalkmasıdır (97, 98). Hatta menopoz sonrası kadınlarda Sİ riskinin erkekleri geçebilecek kadar arttığı düşünülmektedir (99). Dünya genelinde bölgesel olarak en yüksek Sİ insidansının Doğu Asya'da, ulusal olarak da Mısır ve Çin'de en yüksek olduğu görülmüştür (100).

İskemik inme ile ilgili umut verici istatistiksel bir veri de çeşitli koruma ve tedavi yöntemlerinin uygulanmasına paralel olarak Sİ görülme sıklığının azalmasıdır. (2, 80, 101).

C. Nedenleri ve Risk Faktörleri

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde bazı demografik özelliklerin, metabolik dengedeki bozukluklar ile kronik hastalıkların ve olumsuz yaşam tarzının Sİ'ye neden olabileceği ve/veya Sİ için risk faktörü olabileceği belirlenmiştir (102). Yapılan çalışmalar ile yaş artışı ile Sİ riskinin arttığı ortaya konmuş ve yaşlanmanın Sİ için önemli bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (96, 103, 104). Diğer demografik risk faktörü olarak cinsiyetler arası Sİ görülme durumuna bakıldığında erken yaşlarda erkeklerde daha sık görülen Sİ'nin ileri yaşlarda özellikle menopozun başlangıcı ile kadınlarda arttığı rapor edilmiştir (12, 105). Bunların yanı sıra Sİ insidansının yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak siyahi ırkta daha yüksek olması ırkın da Sİ için bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (106, 107).

Serebral damarlarda plaka oluşumuna neden olduğundan ve endotel disfonksiyona yol açarak tromboz oluşumuna zemin hazırladığından dislipidemi/hiperlipidemi (108, 109), hipertansiyon (110-113), hiperglisemi/diyabet (114, 115), obezite (116-118) Sİ'nin

önde gelen risk faktörleridir. Aritmilerle karakterize atriyal fibrilasyon da tromboembolizm/serebroembolizm ile Sİ'ye neden olduğundan risk faktörleri arasında yer almaktadır (119-121). Yaşam tarzı Sİ oluşumu için bir tehdit unsurudur. Bunlardan dengesiz ve yetersiz beslenmenin (malnütrisyon) hem metabolik dengeyi olumsuz etkileyerek dolaylı yoldan Sİ'ye neden olabileceği hem de Sİ'de mortaliteyi arttırdığı ortaya konmuştur (122, 123). Ayrıca yapılan çalışmalar makro ve mikro besin bileşenleri bakımından yeterli olan Akdeniz Diyetinin Sİ insidansını azaltabileceğini göstermiştir (124-126). Sedar yaşam da sağlıklı beslenme gibi dolaylı yoldan Sİ oluşumuna ortam hazırladığından Sİ için risk niteliğindedir (127). Yapılan çalışmalar fiziksel aktivitenin Sİ hastalarında hastalık seyrini olumlu yönde etkileyebileceğini ortaya koymuştur (128). Sigara kullanımının vasküler hasarla tromboz oluşumuna ve kan beyin bariyerinde disfonksiyonuna neden olduğundan Sİ'nin önde gelen risk faktörlerindendir (129, 130). MSS üzerinde eksitotoksikite ve nöronal hasar başta olmak üzere birçok olumsuz etkileri olduğundan alkol kullanımının da Sİ için bir risk faktörü olduğu görülmüştür (131).

D. Patofizyolojisi

Sİ, denge motor koordinasyonda bozukluklarla, somatosensoriyel kayıplarla ve kavrama gücünde zayıflamayla kendini gösterir (46). Fiziksel bu değişim Sİ'nin patofizyolojik sürecinde duyu ve motor nöronların disfonksiyonuna neden olan yoğun nöronal hasarın ve ölümün meydana gelmesidir (45). Sİ nedenli nöronal hasarın mevcut tıkanıklığın giderildiğinde ve iskemik bölge yeniden reperfüze olduğunda azalması beklenirken R'nin, Sİ hasarını şiddetlendirdiği görülmüştür. (7, 8). Bu durum “deklemp şoku (declamping shock)” olarak adlandırılmaktadır (9, 10) . Söz konusu patofizyolojik süreçte yalnızca Sİ hasarından bahsetmek yetersiz kalacağından Sİ ve R hasarının beraber incelenmesi gerekmektedir.

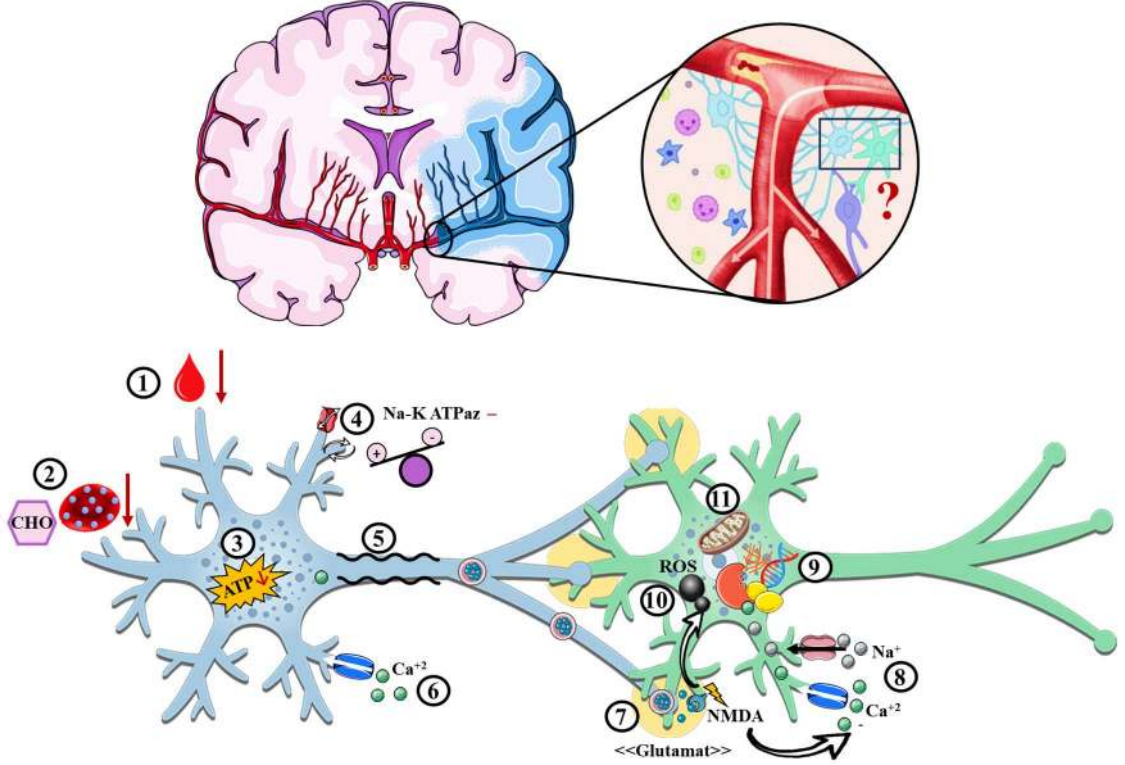
Sİ/R hasarı glikoz ve oksijen yoksunluğu görülen dokuya ait hücrede (nöronda) enerji birimi olan adenosin trifosfat (ATP)'in sentezlenememesi ve tükenmesi ile tetiklenir (132). Hücrelerde ATP'nin sentezlenememesi ve tükenmesi büyük hasarlara yol açabilen bir patofizyolojik sürecin başlangıcıdır. Hücrelerde ATP'ye bağımlı olan ve hücre içi ile hücre dışı iyon dengesini sağlayan pompalardan sodyum potasyum ATPaz (Na-K ATPaz) pompası, ATP'nin parçalanması ile hücre membranında Na^+ ve K^+ iyon değiştiricisi olarak görev alan bir enzimdir (133). Na-K ATPaz aktivitesinde her ATP parçalanması ile 2 K^+ hücre içine alınır ve 3 Na^+ hücre dışına çıkar (133). Bu iyon değişikliği ile hücre içi ve hücre dışı iyon dengesi sağlanarak hem iyon (Na^+ ve K^+)

gradyanı hem de hücrenin dinlenme membran potansiyeli korunur. Hücrelerde yeterli düzeyde ATP'nin bulunmaması özellikle hücre içi iyon konsantrasyonlarında dengesizliğe neden olur (134). Bu da hücrede dinlenme membran potansiyeli korunmaması sonucu hücre zarında sürekli bir depolarizasyon meydana gelir (134). Nöronların sürekli depolarize olması bir aksiyon potansiyeli oluşmasına ve oluşan bu aksiyon potansiyeli de presinaptik terminallere ulaştığında voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının açılarak hücre içerisine Ca^{+2} iyon girişine neden olur (135). Ca^{+2} girişi ile glutamatın sinaptik boşluğa salınımı gerçekleşir (135).

Sinaptik boşluğa salınmış glutamat, nöronlarda iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki tip reseptörü ile aktivite gösterir. İyonotropik reseptörler N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propiyonik asit ve kainat olarak adlandırılan üç alt gruba ayrılır (136). Sİ sırasında meydana gelen patofizyolojik süreçte özellikle NMDA reseptörleri öne çıkar. Çünkü bu reseptörler aktive olduklarında hücre içine aşırı miktarda Na^{+} ve Ca^{+2} iyonlarının girişi gerçekleşir (137). Hücre içerisine Na^{+} girişi ile beyinde ödem oluşumuna ve serebral hasara zemin oluşturur (138). Bunun yanı sıra hücreye yüksek düzeylerde Ca^{+2} akışı Ca^{+2} homeostazının bozulmasına ve onu takip eden bir dizi hücrenel olay ile eksitotoksisteye neden olur. Hücre içine NMDA reseptörü kaynaklı Ca^{+2} girişi hücredeki Ca^{+2} 'a bağımlı proteaz, lipaz ve endonükleazları aktive eder. Bu enzimlerin aktivasyonu da hücre iskeleti, hücre zarı ve DNA gibi hücrenel bileşenlerin ve dolayısıyla hücrenel fonksiyonun bozulmasına neden olur (132). Enzimler aynı zamanda mitokondriyal lipid ve proteinlerin de parçalanmasına yol açar ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur. Tüm bunlar mitokondrinin fonksiyonel bozukluğu ve oksidatif stres ile sonuçlanır. Meydana gelen bu mitokondriyal disfonksiyon hücrenel işlevlerin kaybedilmesine ve nöronal hasara yol açar.

Sİ/R nedenli nöronal hasarın en yoğun olduğu bölge kor (çekirdek) ve bu bölgeyi çevreleyen alan ise penumbra alanı olarak adlandırılır (11). Kor bölgesindeki hasar daha çok geri dönüşümsüz/kalıcı iken, penumbral alanda hasarın hafiflediği ve hücrenel faaliyetlerin devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle penumbra alanı, potansiyel olarak kurtarılabilir bir alan olarak nitelendirilmiş, Sİ/R hasarı ve iyileşmesi ile ilgili çalışmalar için bir hedef haline gelmiştir (12-18). Bu çalışmalar aynı zamanda iskemik hasarın iyileşmesi sürecinde penumbradaki otofajik ve apoptotik aktivitenin önemli rol oynadığını göstermiştir. Çünkü hücrelerdeki glikoz ve oksijen yoksunluğuna bağlı ATP sentezlenememesi ve tükenmesi ile başlayan eksitotoksistite, mitokondriyal disfonksiyon

ile apoptoz gibi nöronal hasar ve hücrelölüm yollarının aktivasyonuna ve otofaji gibi inflamatuvar yanıtların oluşmasına neden olur (139).



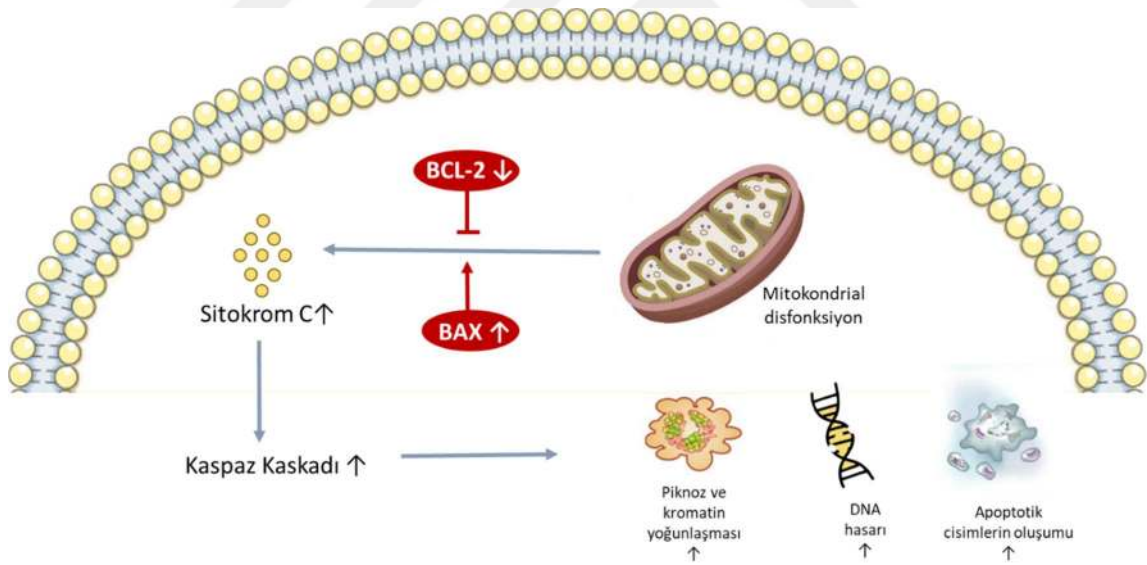
Şekil 2. 4. Sİ'nin patofizyolojisi (CHO: glikoz, ATP: Adenozin tri-fosfat, NMDA: N-metil-D-aspartat ROS: reaktif oksijen türleri, 1: nöronal dokuya ulaşan kan hacmi azalır, 2: nöronlar tarafından kullanılacak glikoz ve oksijen miktarı azalır, 3: hücre içerisindeki ATP tükenir, 4: ATP bağımlı iyon kanalları aktivasyonu durur ve iyon gradyanı bozulur, 5: hücre membranı depolarize olur, 6: hücre içerisine Ca^{+2} girişi artar, 7: sinaptik boşluğa glutamat salınır ve postsinaptik nörondaki NMDA reseptörüne tutunur, 8: NMDA aktivasyonu ile hücre içerisine aşırı miktarda Na^{+} ve Ca^{+2} girişi meydana gelir (eksitotoksisite), 9: Ca^{+2} 'un kofaktörü olduğu proteazlar, nükleazlar ve lipazların aktivitesi hücre yapısını bozabilecek kadar artar 10: NMDA reseptör aktivasyonu hücre içi ROS'ların artışına ve oksidatif strese neden olur, 11: mitokondrial disfonksiyon meydana gelir.)

a. Apoptoz:

Apoptoz, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada morfolojik değişikliklere yol açan programlı hücre ölümüdür. (140). Apoptoz sırasında meydana gelen ilk morfolojik değişiklik, hücre çekirdeğinde büzüşme (piknoz) ve buna eşlik eden kromatin

yoğunlaşmasıdır. Bunu sitoplazmada vakuol oluşumu ile yoğunlaşma takip eder (141). Ardından hücre iskeleti ile hücre içi madde taşıma sistemler bozulur ve komşu hücreler tarafından fagosite edilebilir apoptotik cisimler oluşur (142).

Apoptoz hücresel düzeyde incelendiğinde birçok pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bu süreçte rol aldığı görülmüştür. Bu proteinler arasından B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) ve BCL-2 ile ilişkili X (BAX) proteinleri öne çıkar (143, 144). BCL-2 anti-apoptotik protein olup mitokondriden sitokrom C salınımını inhibe ederken BAX ise BCL-2'nin aksine pro-apoptotik olup mitokondriden sitokrom C salınımını uyarır (143, 144). Sitokrom C salınımı piknoz ve kromatin yoğunlaşması, DNA hasarı ve apoptotik cisimlerin oluşmasına neden olan kaspaz kaskadını aktive eder (145). Sİ/R'nin patofizyolojik seyrinde meydana gelen mitokondriyal disfonksiyona BCL-2'nin azalması ve BAX'ın artışı eşlik eder. Tüm bunlar Sİ/R sitokrom C salınımı artışı ve bunu takip eden kaspaz kaskadı aktivasyonundaki artışla sonuçlanır. Bu da Sİ'de piknoz ve kromatin yoğunlaşması, DNA hasarı ve apoptotik cisimlerin oluşması ile hücresel hasarın artışına neden olur.



Şekil 2. 5. Sİ'de apoptozun seyri (BCL-2: B hücreli lenfoma-2, BAX: BCL-2 ile ilişkili X)

b. Otofaji:

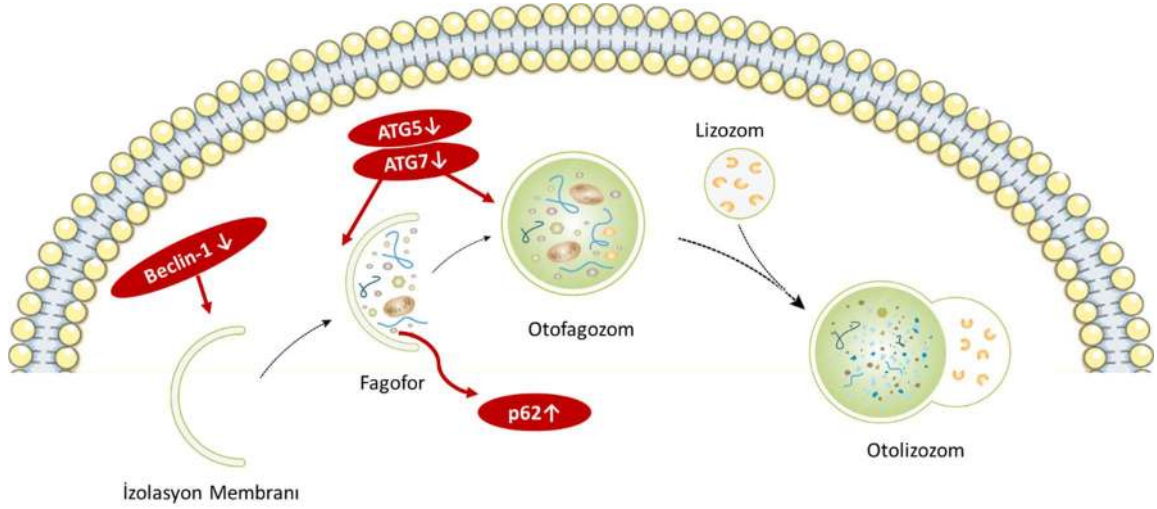
Otofaji (Autophagy) Latince kökenli bir kelime olup kendi anlamına gelen “*auto*” ile yemek anlamındaki “*phagy*” sözcüklerinin birleşiminden oluşmuştur (146). Hücrenin

kendi kendini sindirmesi olayını ifade etmekte kullanılır. Bu olay hayvan hücrelerinde lizozomlar, bitki ve maya hücrelerinde ise vakuoller ile gerçekleşir (147).

Otofajinin temel tetikleyicileri hücredeki hipoksik ortam, azalmış ATP düzeyleri ve mitokondriyal hasar olup otofajik sürecin başlatılmasındaki temel amaç hücrel hasarın en aza indirilmesidir. (148). Hücrede otofajik süreç temelde besinsel geri dönüşüm ile enerji üretiminin sağlanması (149) ve özellikle hasarlı mitokondrinin parçalanması (mitofaji) amacıyla (150) izolasyon membranı adı verilen bir otofagozomal membran oluşturularak başlar (147, 151). Bu membran uzayarak ve genişleyerek fagofor olarak adlandırılan ve çeşitli çözünabilir sitoplazmik materyaller ve organelleri çevreleyen hal alır (147, 151). Membrandaki bu uzama, çevrelediği sitoplazmik materyaller ve organelleri ihtiva eden ve otofagozom da denilen bir kesecik oluşturana kadar devam eder (147, 151). Akabinde otofagozomlar lizozom ile birleşir ve otolizozom adı verilen kompleksi oluşturarak içerisindeki tüm bileşenler bozulur (147, 151). Otofagozom içerisindeki çözünabilir materyallerden özellikle yanlış katlanmış proteinlere tutunarak otofajide bozulan p62 otofaji için biyobelirteç niteliğinde bir proteindir. Dolayısıyla otofajik sürecin aktivasyonu p62 ifadesindeki azalmaya neden olur (152).

Otofajik süreçte özellikle Beclin-1 olarak adlandırılan protein ve otofaji ilişkili gen (ATG) tarafından kodlanan ve ATG proteinleri olarak bilinen proteinler aktif rol alır. Beclin-1 izolasyon membranı oluşumunun indüklenmesindeki rolü ile bilinir. ATG proteinlerinden özellikle ATG5 ve ATG7 fagofor ve otofagozom oluşumunda görevlidir (153).

Literatürde Sİ/R patofizyolojisinde oluşan hasarın nedeninin otofajinin azalması olabileceğine dair mevcut görüşler doğrultusunda Sİ/R'de otofajiyi indükleyen Beclin-1, ATG5 ve ATG7 protein ifadelerinin azalması; otofajide tükenen p62 proteinin ifadesinin artması beklenmektedir.

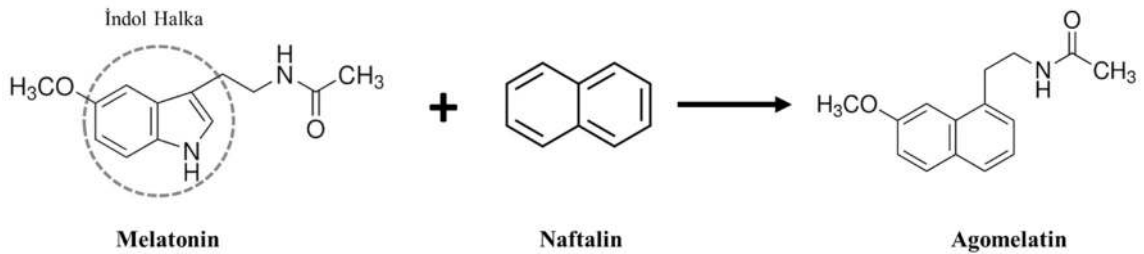


Şekil 2. 6. Sİ’de otofaji süreci (ATG5: otofaji ilişkili gen 5, ATG7: otofaji ilişkili gen 7)

2.3. Agomelatin

2.3.1. Sentezi ve Kimyasal Yapısı

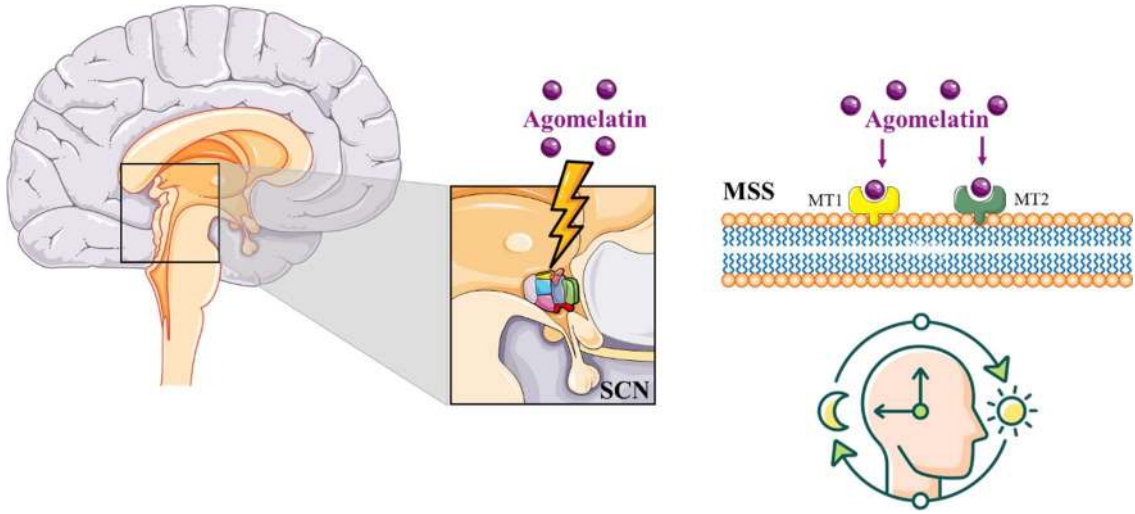
Agomelatin, non-monoaminerjik etki mekanizmasına sahip bir antidepresandır. Etki mekanizması melatonergic agonist olması ve serotonergic antagonisti olması özelliğine dayanır (154). Agomelatinin sentezi, Friedel-Crafts asilasyonu ve ardından Willgerodt-Kindler reaksiyonları, olarak adlandırılan bir dizi biyoreaksiyon ile gerçekleşir. Melatonin ve naftalinden türetilen Agomelatin, melatoninin yapısındaki indol halka ile naftalinin biyoizosterik olarak değiştirilmesiyle sentezlenir. Agomelatinin bu sentezi Şekil 2.7’de verilmiştir (155). Şekil 2.7’de açık formülü gösterilen Agomelatinin kapalı formülü $C_{15}H_{17}NO_2$ olup moleküler ağırlığı 243,301 g/mol’dür.



Şekil 2. 7. Agomelatin’in sentezi ve kimyasal yapısı

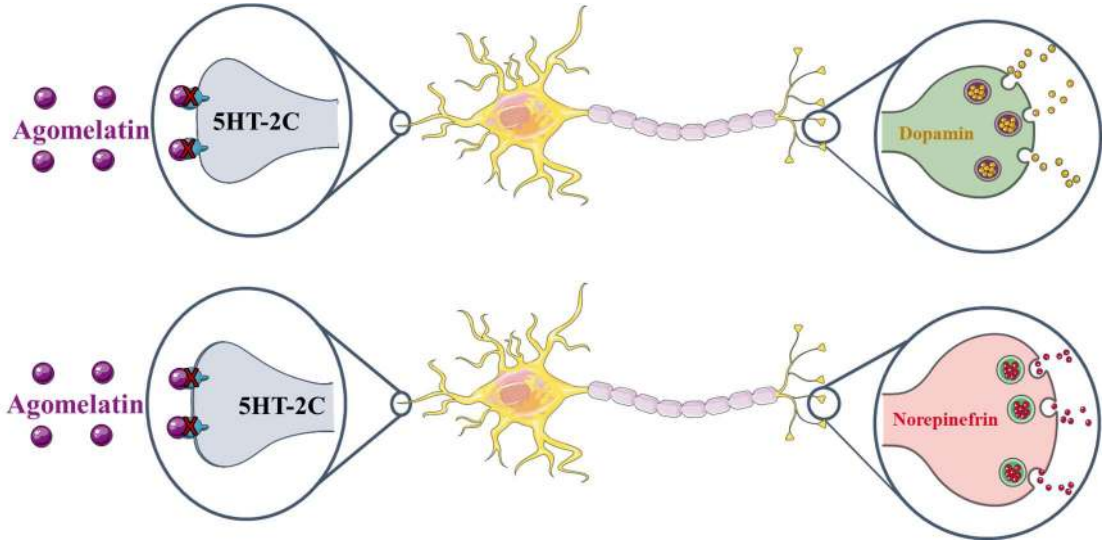
2.3.2. Fizyolojik Etkileri

Agomelatin, melatonerjik reseptörlerden melatonin reseptörü tip 1 (MT1) ve tip 2 (MT2) agonisti ve serotonerjik reseptörlerden 5-Hidroksitriptamin-2C (5HT-2C) antagonistedir. Bu iki özelliği ile suprakiazmatik nöron (SCN) ateşlemesini arttırdığı görülmüştür (156). SCN üzerindeki aktivitesiyle beraber MSS'deki MT1 ve MT2 reseptör agonistik etkisiyle de sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol alır (Şekil 2.8) (157).



Şekil 2. 8. Agomelatinin sirkadiyen ritmin düzenlenmesindeki rolü (MSS: merkezi sinir sistemi, SCN: Suprakiazmatik nükleus, MT1: Melatonin reseptörü tip 1, MT2: Melatonin reseptörü tip 2)

Serotonin reseptör alt tipi olan 5HT-2C reseptörlerinin antagonisti olmasıyla bu reseptörleri bloke ederek dopamin ve norepinefrin salınımını arttırdığı da görülmüştür (Şekil 2.9) (158, 159).



Şekil 2. 9. Agomelatin 5HT-2C reseptörüne antagonistik etkisi (5HT-2C: 5-Hidroksitriptamin-2C)

Depresyon bozukluğu olan yetişkin hastalara Agomelatin uygulamasının etkilerine bakıldığı başka bir çalışmada depresif bozukluğuna terapötik etki edebileceği ve bu etki ile uyku kalitesini iyileştirebileceği ve serum norepinefrin ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) düzeylerini arttırabileceği ortaya konmuştur (160). Agomelatinin uyku-uyanıklık döngüsünü düzenlediği, uyku kalitesini iyileştirdiği ve hipokampal BDNF seviyelerini arttırdığı yapılan diğer bir çalışmada da ortaya konmuştur (161) Başka çalışmalar ile de Agomelatinin BDNF modülasyonunda rol aldığı ve hipokampal BDNF ekspresyonunu, pozitif nöron sayısını ve gen ifadesini arttırarak bellek üzerinde etkili rol oynadığı rapor edilmiştir (162, 163). Agomelatinin BDNF modülasyonunu melatonerjik agonistik ve serotonerjik antogonistik aktivitelerinin sinerjik etkisiyle gerçekleştiği ortaya konmuştur (164).

Agomelatinin uyku kalitesini düzenlemesi ile beraber nörogenezi arttırabileceği ve nöroinflamasyonu azaltabileceği sonuçlanmıştır (165). Agomelatinin özellikle dentat girus olmak üzere beynin çeşitli bölgelerinde nöronal proliferasyonu ve nörogenezi arttırdığı görülmüştür (166). Agomelatinin MT1 ve MT2 agonizmi ile 5HT2C antagonizmasının ortak etkisiyle nöronal proliferasyonu arttırarak nörogenezi desteklediği belirtilmiştir (167) Agomelatinin dentat girusta nörogenezi arttırmasıyla beraber nöroinflamasyonu da iyileştirdiği gösterilmiştir (41, 165). Agomelatinin

hipokampüste lipopolisakkarit nedenli nörotoksisiteyi ERK/SorLA/BDNF/TrkB yolunu modüle ederek hafiflettiğini gösteren başka bir çalışmada da aynı zamanda hafıza ve öğrenme bozukluklarını iyileştirdiği bildirilmiştir (168). Benzer bir çalışmada ise Agomelatinin doksorubisin ile indüklenmiş kortikal ve hipokampal beyin hasarını TNF-alfa/NF-kB yolunun inhibisyonu ile iyileştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı ortaya konmuştur (169). Yapılan başka bir çalışma da yine hipokampüste Agomelatinin sisplatin kaynaklı nörotoksisiteyi azalttığı sonucuna varılmıştır. Aynı çalışma Agomelatinin sisplatin nedeniyle azalan nöronal hücre canlılığını arttırdığını ve zayıflayan lokomotor aktiviteyi iyileştirdiğini göstermiştir (39). Ayrıca Agomelatinin APP/PS1 transgenik farelerde alzheimerin temel patolojisi olan amiloid- β birikimi ve tau hiperfosforilasyonunu azalttığı görülmüştür (170). Agomelatinin beyin endotel hücrelerinde de izofluran etkisiyle azalmış nöronal hücre canlılığını arttırdığını ve şiddetlenen inflamasyonu hafiflettiği gösterilmiştir (171). Yüksek doz glikoz uygulaması ile *in vitro* diyabetik nöropati modeli oluşturulmuş dorsal kök gangliyonlarında Agomelatin uygulaması ile hücre canlılığının arttığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada Agomelatin uygulamasının *in vivo* diyabetik nöropati modeli oluşturulan farelerin de raphe çekirdeği, periakvaduktal girus, amigdala ve nükleus accumbens gibi beyin bölgelerindeki inflamasyonu hafiflettiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada dikkat çeken bulgulardan biri ise diyabetik nöropati modeli oluşturulan farelerde Agomelatin uygulamasının diyabetik parametreleri iyileştirmesi olmuştur. Agomelatinin MSS'deki aktivitesinin yanı sıra periferde metabolik etkilerine de dikkat çekmiştir (172).

Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde Agomelatin tedavisinin epididimal ve adiopzal yağ dokusundaki arttırdığı ile vücut ağırlığını azalttığı görülmüştür. Bunun yanı sıra Agomelatin uygulanan gruplarda kan glikoz seviyelerinin azalması ve insülin seviyelerinin artması insülin direncini ve diyabetik parametreleri iyileştirebileceğini göstermiştir. Ayrıca Agomelatin uygulamasının HDL'yi arttırması, LDL ve total kolesterolü azaltmasıyla serum lipid profili üzerine etkileri olabileceğini düşündürmüştür (173). Bununla beraber Agomelatin uygulamasının yüksek fruktozla beslenen sıçanlarda serum kolesterolü ve triaçilgliseridi düşürdüğü görülmüştür (174). Başka bir çalışma da Agomelatinin yüksek yağlı diyetle indüklenen obez ve insüline dirençli sıçanlarda vücut ağırlığını, iç organlarda yağ birikimini, glikoz toleransını ve insülin direncini iyileştirebileceğini göstermiştir. Aynı çalışmada böbrek hasarını ile fonksiyon bozukluğunu iyileştirebileceği, renal endoplazmik retikulum stresini hafifletebileceği

gösterilmiştir. Aynı çalışmada anti-apoptotik olan BCL-2 protein seviyesini arttırarak ve pro-apoptotik olan BAX protein seviyesini arttırarak apoptozu inhibe ettiği ortaya konulmuştur (175). Yine obez sıçanlarda yapılan benzer bir çalışma Agomelatinin otofajik aktiviteyi arttıran LC3- II/LC3-I oranını ve Beclin-1, ATG5 protein seviyelerini arttırdığı ve baskılayan mTOR protein seviyesini azalttığı belirlenmiştir (176). Agomelatinin diyabetik nefropati modeli oluşturulmuş sıçanlarda da insülin direncini ve böbrek fonksiyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir (177).

Agomelatinin hem nöronal proliferasyonu, nörogenezi arttırması ve nöroinflamasyonu azaltması hem de Sİ/R nedenleri arasında yer alan metabolik parametreleri iyileştirmesi Sİ/R hasarını hafifletebileceğini akla getirmektedir. Planlanan bu çalışmada; literatürde hala gizemini koruyan Agomelatinin Sİ/R nedenli nörolojik defisit ve inflamasyon ile ilişkisinin incelenmesi somatosensöriyel kayıp, denge-motor koordinasyon kaybı, güç kaybı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve beyin dokusundaki apoptotik ve otofajik protein seviyelerinin analizi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneyin Yapıldığı Merkez

Çalışmadaki uygulamaların tamamı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafınca 27.06.2022 tarihli toplantının 2020/8-7 sayılı kararı ile onaylanan ve 15128 HAYBİS kayıt numaralı etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı. Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde (İNÜTF-DEHÜM) ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak hayvanların sayısı; hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması yaklaşık 300 g, standart sapması 10 g, %4 sapma, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) (Güç=0.80) olduğunda hayvanların 4 gruba ayrılması durumunda her bir grupta en az 10 hayvanın olması gerektiği güç analizi (Power Analiz) ile belirlendi. Bu kapsamda çalışmada 10-12 haftalık 40 hayvan (*Sprague Dawley* ırkı erkek sıçan) kullanıldı.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Tasarımı

Deneyde kullanılan sıçanlar deneye başlangıç günü itibarıyla tekli kafeslere yerleştirildi. Tekli barındırma ortamı hayvanlarda stres oluşturacağından sıçanların 7 gün boyunca tekli yaşam koşullarına ve kafes stresine adapte olmaları sağlandı. Çalışmaya dahil edilen tüm sıçanlar Kontrol, Sİ/R, Sİ/R+20 mg/kg Agomelatin ve Sİ/R+40 mg/kg Doz Agomelatin olmak üzere rastgele atama yöntemiyle 4 gruba ayrıldı ($n=10$). Çalışma süresince tüm sıçanlar sıcaklığı $21\pm2^{\circ}\text{C}$ ' de sabit tutulan ortamda barındırıldı. Sıçanların barındırıldığı ortam için 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü uygulandı. Hayvanlara *ad libitum* olarak beslenmeleri için pellet halindeki standart sıçan yemi, su ihtiyaçları için ise normal musluk suyu verildi. Şekil 3.1'de de gösterilmekte olan deney tasarımı şu şekilde özetlenebilir:

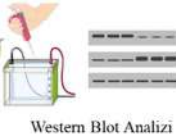
1- Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Dördüncü gün hayvanlara sadece KKA, İKA ve EKA izolasyonu ile cerrahi operasyon taklidi yapıldı ancak OSA damarının oklüzyonu yapılmadı. Cerrahi operasyonu takip eden üç günde de nörolojik defisit skoru (NDS), rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deneyin yedinci gününde davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında 2,3,5-trifenil tetrazolium klorür (TTC) boyama yöntemi ile infarkt alanı hesaplandı. Western Blot

yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve BAX) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

2- Sİ/R Grubu: Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Dördüncü gün hayvanlara 60 dakikalık Sİ modeli oluşturuldu ve 60 dakikanın sonunda R süreci başlatıldı. R başladıktan bir saat sonra Agomelatin çözücüsü olan %1'lik Hidroksietil Selüloz (HES)'dan 1 ml intraperitoneal uygulandı. Cerrahi operasyonu takip eden üç günde de NDS, rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deneyin yedinci gününde davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve BAX) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

3- Sİ/R+20 mg/kg Agomelatin Grubu: Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Dördüncü gün hayvanlara 60 dakikalık Sİ modeli oluşturuldu ve 60 dakikanın sonunda R süreci başlatıldı. R başladıktan bir saat sonra 1 ml hacminde %1'lik HES'de çözdürülen Agomelatin (20 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulandı. Cerrahi operasyonu takip eden üç günde de NDS, rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deneyin yedinci gününde davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve BAX) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

4- Sİ/R+40 mg/kg Agomelatin Grubu: Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Dördüncü gün hayvanlara 60 dakikalık Sİ modeli oluşturuldu ve 60 dakikanın sonunda R süreci başlatıldı. R başladıktan bir saat sonra 1 ml hacminde %1'lik HES'de çözdürülen Agomelatin (40 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulandı. Cerrahi operasyonu takip eden üç günde de NDS, rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deneyin yedinci gününde davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve BAX) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

GRUPLAR	ÖN TEST	CERRAHİ OPERASYON	UYGULAMA	UYGULAMA SONRASI TESTLER VE ANALİZLER
Kontrol Grubu	 Rotarod Testi	Kontrol Grubu'na sadece damar izolasyonu olacak, Sİ/R modeli oluşturulmayacak.	 İp yolla 1 ml serum fizyolojik	 Rotarod Testi
Sİ/R Grubu	 Yapışkan Çıkarma Testi		 İp yolla 1 ml Hidroksietil Selüloz	 Kavrama Gücü Testi (Grip Strength)
Sİ/R+20 mg/kg Agomelatin Grubu	 Kavrama Gücü Testi (Grip Strength)	Kontrol Grubu dışındaki diğer gruplara Sİ/R modeli oluşturulacak	 İp yolla 1 ml 20 mg/kg Agomelatin	 Yapışkan Çıkarma Testi
Sİ/R+40 mg/kg Agomelatin Grubu			 İp yolla 1 ml 40 mg/kg Agomelatin	 Nörolojik Defisit Skorlama
				 TTC Analizi (Infarkt alanının hesaplanması)
				 Western Blot Analizi

Şekil 3. 1. Deney tasarımı (Sİ/R: serebral iskemi/reperfüzyon, TTC: 2,3,5-trifenil tetrazolium klorür, İp: intraperitoneal)

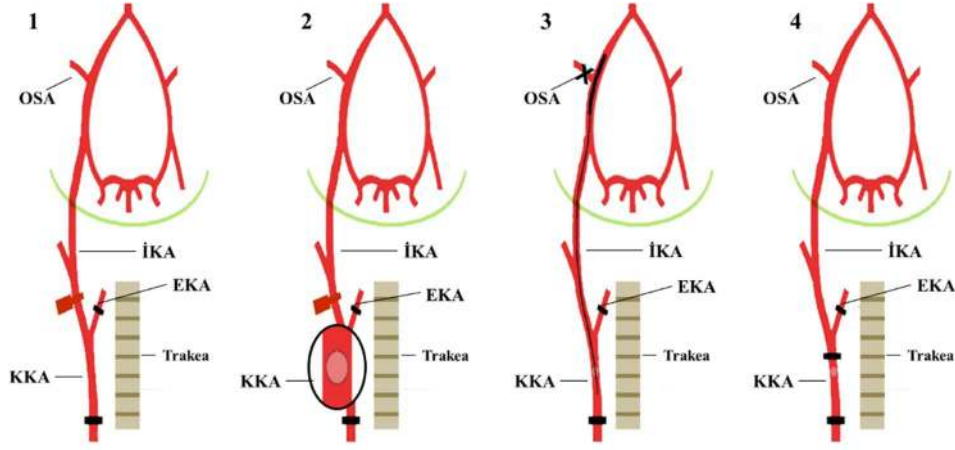
3.4. Agomelatin ve HES Çözeltilerinin Hazırlanması

Agomelatin çözücüsü olan %1'lik HES çözeltisi 1 g HES'in 100 ml distile su ile karıştırılması ile elde edildi. Agomelatin uygulanacak gruplardaki her hayvanın ağırlığına göre kilogram başına 20-40 mg (42) olacak şekilde toz formundaki Agomelatin (sigma, lot no: #116M4702V) 1 ml %1'lik HES çözeltisinde çözdürüldü (178, 179).

3.5. Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması

Hayvanların cerrahi operasyonlarına anestezi uygulaması tamamlandıktan (hayvanlar tamamen anesteziye girdikten) sonra başlandı. Sıçanlar intramüsküler yolla 70 mg/kg ketamin, 8 mg/kg (180) uygulanması ile anestezi altına alındı ve sıçanların pençe kıstırma yanıtları ile anesteziye girip girmediği değerlendirildi. Anesteziye girdiği saptanan hayvanların boyun bölgesindeki yaklaşık 3x4 cm²'lik alanın tıraş edilmesi ile cilt görünür hale getirildi. Görünür hale gelen cilt bölgesi povidon iyot solüsyonu ve %70'lik etanol ile dezenfekte edilerek cerrahi işlemlere başlandı.

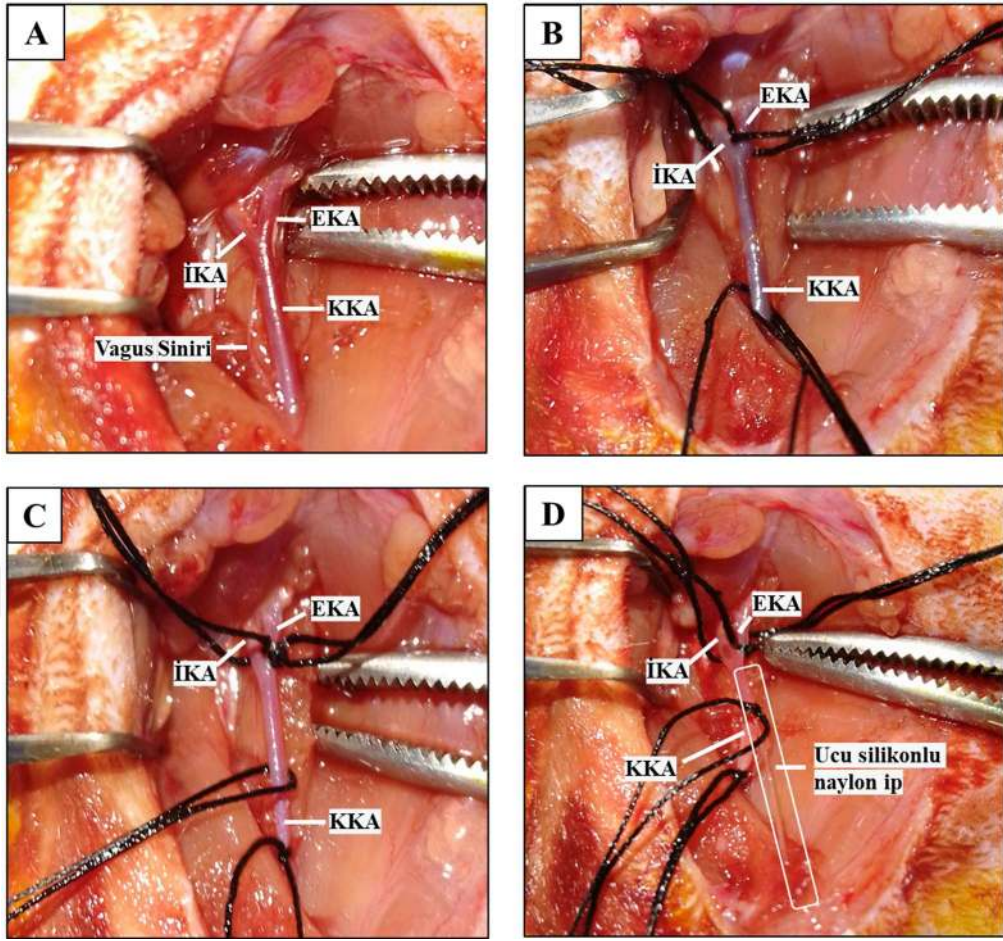
Deney sırasında hayvanların vücut sıcaklıkları rektal prob yardımıyla 36.5-37°C'de sabit tutulacak şekilde kontrol edildi. Fokal Sİ modeli koizumi intraluminal filaman tekniği kullanılarak sağ orta serebral arterin oklüzyonu (OSAO) ile oluşturuldu. Modelin şematik gösterimi Şekil 3.2'de yer almaktadır.



Şekil 3. 2. Deneysel Sİ/R modelinin şematik gösterimi (KKA: kommon karotid arter, EKA: eksternal karotid arter, İKA: internal karotid arter, OSA: orta serebral arter, 1: KKA ve EKA'daki kan akışı tamamen kesilir ve İKA klemplenir, 2: KKA'da küçük bir kesi açılır, 3: İKA klempli açılarak KKA'da açılan kesi içerisinden İKA boyunca OSA'ya ulaşana dek ucu silikonlu naylon ip gönderilir ve OSA kan akışı kesilir, 4: ucu silikonlu naylon ip çıkarılarak reperfüzyon başlar)

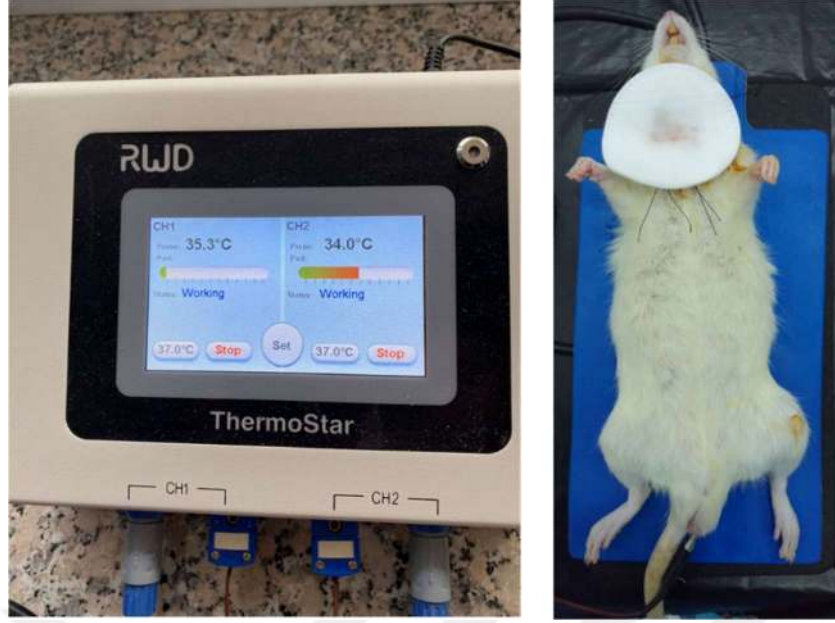
Model oluşturulurken, hayvanlar sırtüstü pozisyonda yatırılarak orta hattın 5-6 mm sağına 3-4 cm uzunluğunda cilt üzerinden vertikal yönde kesi yapıldı. Bu kesi ile süperfisyel fasyaya ulaşılarak altında yer alan sternohyoid, digastrik ve sternomastoid kaslarına ulaşıldı. Bu kasların daha derininde kalan sağ KKA, İKA ve EKA kendilerini çevreleyen vagus siniri ve dokulardan izole edilerek ortaya çıkarıldı (Şekil 3.3A). Kontrol grubunda bu aşamadan sonra açılan kesi bölgesinden dikişler atıldı. Dikişi takip eden 1 saatin sonunda bu gruba ait hayvanlara intraperitoneal yolla 1 ml %0.9'luk izotonik sodyum klorür çözeltisi verildi.

Sİ/R ve Sİ/R+Agomelatin gruplarında ise izolasyondan sonra KKA'dan iki, EKA ve İKA'dan birer tane her biri yaklaşık 5'er cm uzunluğunda olan 5-0 ipek sütürler geçirildi (Şekil 3.3B). EKA proksimalden, KKA da distalden bağlanarak buradaki kan akışı ilerleyen aşamada KKA'da açılacak keside kan kaybı olmaması için durduruldu (Şekil 3.3C). İKA geçici olarak bir mikrovasküler klemple yardımıyla ile klemplendi. İKA ve EKA bifurkasyonun 1 mm proksimalinden sağ KKA'ya bir kesi açıldı. OSAO için ucu silikon ile kalınlaştırılmış olan yaklaşık 0.39 mm çapında 4/0 naylon ip bu kesi bölgesinden damar içine sokularak İKA'ya doğru yöneltildi. İp İKA klempe ulaştığında klemple kaldırıldı ve OSA doğrultusunda yaklaşık 18-20 mm ilerletildi (Şekil 3.3D).



Şekil 3. 3. Deneysel Sİ modelinin oluşturulması (KKA: kommon karotid arter, EKA: eksternal karotid arter, İKA: internal karotid arter. KKA, EKA ve İKA vagus siniri ve çevredeki dokulardan izole edildi (A), KKA'dan ikişer EKA ve İKA'dan 5 cm'lik birer parça ipek ip geçirildi (B), KKA'dan geçirilmiş iplerden biri ile EKA'dan geçirilmiş ip düğümlendi (C), KKA'daki düğümün yukarısında bir kesi açıldı, bu kesiden ucu silikonlu naylon ip damar içerisine alınarak İKA boyunca ilerletildi ve ip yeterince ilerledikten sonra tekrar kaymaması için KKA'daki düğümlenmemiş (serbest) ipek ip kesinin yukarisından bağlandı (D))

Ucu silikonlu naylon ip 60 dakika boyunca damar içerisinde bekletilerek OSAO sağlandı ve ilgili bölgede serebral kan akışı kesildi. Bu sürede hayvanlar ısı minderi üzerinde bekletilerek rektal prob yardımıyla vücut sıcaklıkları korundu (Şekil 3.4). Altmış dakikanın sonunda ucu silikonlu naylon ip geri çekilerek R sağlandı.



Şekil 3. 4. Sİ sürecinde rektal prob yardımıyla hayvanların vücut sıcaklıklarının korunması

Hayvanlar anestezi altındayken dikişler atıldı ve kafeslerine alındı. R başladıktan 1 saat sonra hayvanlara intraperitoneal yolla 1'er ml hacimde HES (%1) veya Agomelatin (20kg/mg veya 40 kg/mg) uygulandı.

3.6. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri

NDS Testi

NDS testi, Bederson skorlama metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Hayvanların nörolojik durumlarının gözlemlenmesi R başladıktan 24 saat sonra tüm hayvanlara uygulandı (Şekil 3.5). Modifiye edilmiş Bederson skorlama metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.1: Bederson skorumaya metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi

Puan	Nörolojik Durum
0 Puan	Sağlıklı nörolojik durum (defisit yok)
1 Puan	Kuyruėundan tutup kaldırıldığında konlateral �n ayakta fleksiyon
2 puan	Konlateral �n ayakta fleksiyon ve lateral itmeye karşı azalmış direnç
3 puan	Yürürken konlateral yöne doğru daire çizme
4 puan	Kuyruėundan tutup kaldırıldığında dönme hareketi veya nöbet aktivitesi
5 puan	Spontan olarak yürüyememe



şekil 3. 5. Hayvanların nörolojik durumunun gözlemlenmesi

Rotarod Testi

Rotarod cihazı kendi etrafında dönen 4 kulvarlı silindir bir banttan oluşmaktadır. Bu bantın dönüş hızı, ivmesi ve süresi ayarlanabilmektedir. Bu test ile dönen bir bant üzerine yerleştirilmiş hayvanın düşmeden kalabildiği süre ölçülerek hayvanların cerrahi işlemler ve S  sonrası denge motor koordinasyonu değerlendirildi. Tüm gruptaki hayvanların cihaza ve teste alışabilmesi için cerrahi operasyonları öncesinde 3 gün boyunca her birine 15 dakika süresince 5 rpm'de  n alıştırma uygulamaları yaptırıldı. Testlere cerrahi operasyonun ertesi günü başlandı ve 3 gün boyunca her gün aynı saatte,

aynı araştırmacılar tarafından yaptırıldı. Gruplardaki tüm hayvanlar bireysel bölmelerine dönen çubuğun tersi yönünde yerleştirildi. Akabinde rotarod cihazı 300 saniye içerisinde 4 rpm'den 40 rpm'ye çıkacak şekilde ayarlandı ve sıçanların bu ivmeli harekette dönen bandın üzerinde kalabildiğı süre ölçüldü (Şekil 3.6). Bu ölçüm her bir sıçan için 5 dakika aralıklarla 3 kez tekrarlandı (Şekil 3.7).



Şekil 3. 6. Rotarod cihazının ayarlanması ve hayvanların yerleştirilmesi



Şekil 3. 7. Hayvanlara rotarod testinin yapılması

Yapışkan Çıkarma Testi

Yapışkan çıkarma testi hayvanlardaki somatosensoriyel duyarlılığı ölçer. Bu test hayvanların cerrahi operasyonlarından sonraki duyuşal durumlarını incelemek için tercih edilen bir yöntemdir. Testi yapmak üzere her hayvanın sol ön ayağının (Sİ modeli sağ OSAO ile oluşturulduğu için) distal radial yüzüne eşit boyutlarda kesilmiş (1x1 cm²) yapışkan etiketler yapıştırıldı ve hayvanın etiketi çıkartması beklendi. Bu süreçte kronometre ile süre tutularak hayvanın davranışları gözlemlendi. Etiket hissederek temizlenmeye başladığı ilk an (saniye cinsinden) not edildi. Her bir etiket süresi en fazla 120 saniye ile sınırlandırıldı. Tüm hayvanlara cerrahi operasyonlardan önce 3 gün boyunca günde 1 kez yapışkan testi alıştırmaları yapıldı. Cerrahi operasyonların ertesi gününden itibaren yani R başladıktan 24 saat sonra 3 gün boyunca her gün aynı saatlerde aynı araştırmacılar tarafından yapıldı (Şekil 3.8).



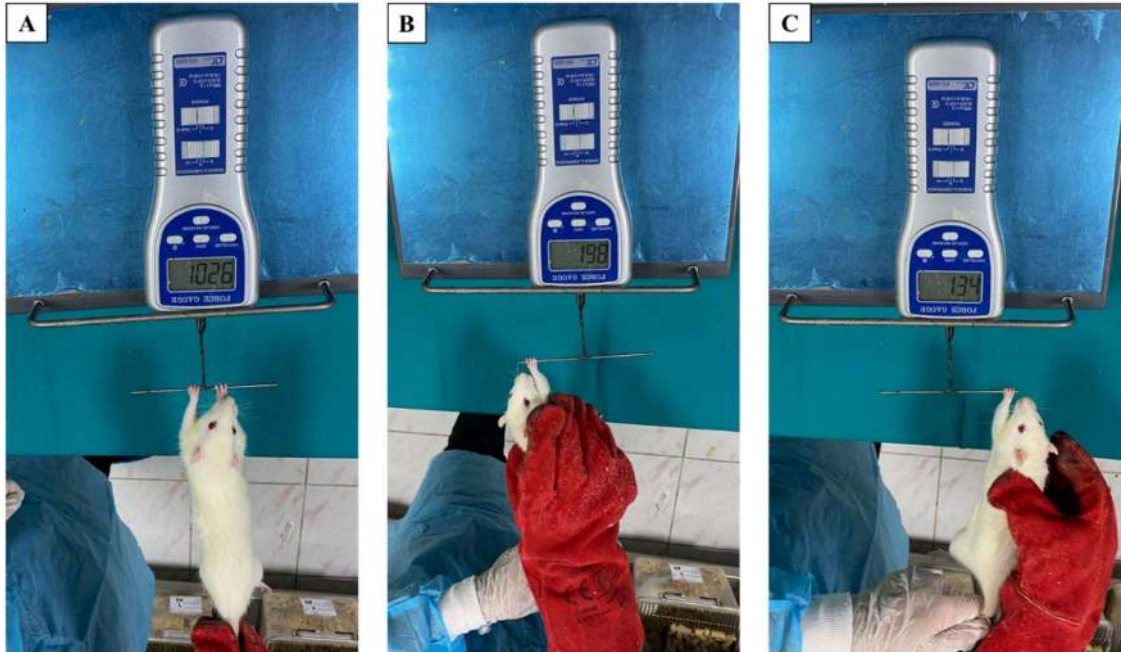
Şekil 3. 8. Hayvanlara yapışkan çıkarma testinin yapılması

Kavrama Gücü (Grip Strength) Testi

Kavrama gücü testi, güç mukavemet cihazı ile hayvanların ekstremitelerinin kuvvetlerini ölçmek için yapılan bir testtir. Değerlendirmede standardizasyonu sağlamak için tüm hayvanlar kuyruklarından çubuğun yukarısına doğru tutuldu ve aşağı doğru hareket ettirilerek çubuğun ortasından iyice kavraması sağlandı. Gövde ve alt ekstremiteler yere paralel bir biçimde tutularak hayvan kavradığı cihaz çubuğunu bırakana kadar çekildi, bıraktığında tamamlandı. Bu işlem her hayvanın her testinde aynı şekilde gerçekleştirildi

ve hayvan cihaz çubuğunu bırakmadan hemen önceki en büyük değer hayvanın güç değeri kabul edildi ve değer G cinsinden kaydedildi.

Bu test günlük olarak her hayvana üst ekstremitelerin ikisi (Şekil 3.9 A), yalnızca sağ (Şekil 3.9 B) ve yalnızca sol (Şekil 3.9 C) ekstremitelere ayrı ayrı 5'er tekrarla yapıldı. Yorulma birikiminin önüne geçmek için hayvanlar her test arasındaki zaman aralığı 1 dakika olacak şekilde dinlendirildi. Hayvanın üst (ön) ekstremitelerinden her birinin ölçümü aynı deneysel prosedür ile yapılarak birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. Ölçümü yapılmayan pençenin, ölçümü yapılan diğer pençenin sonucunu etkilememesi için test sırasında kontralateral pençe tutularak yapıldı. Yapılan 5 tekrarlı test sonuçları arasından en büyük 3 ölçümün ortalaması alınarak sonuçlar hayvanın ağırlığına göre oranlandı (güç/ağırlık oranı). Daha sonra sol ön kavrama kuvveti ile sağ ön kavrama kuvveti oranlandı. Bu test deney süresi boyunca aynı kişiler tarafından gerçekleştirildi. Test sonucunda elde edilen veriler ile grupların mevcut motor fonksiyon kayıpları değerlendirildi.



Şekil 3. 9. Hayvanlara kavrama gücü (grip strenght) testinin yapılması (İki pençe kuvvet testi (A), sağ pençe kuvvet testi (B), sol pençe kuvvet testi (B))

3.7. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması

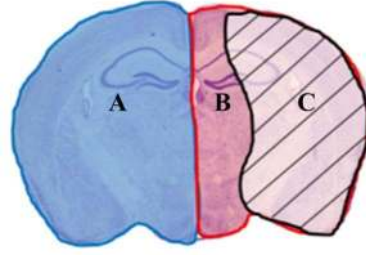
Yedinci gün davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edildi ve beyin dokuları çıkartıldı. Alınan beyin dokuları Western Blot analizleri yapılana kadar uygun koşullarda (-80 °C’de) muhafaza edildi. TTC boyama yapılacak beyin dokuları kuru buz üzerinde dondurularak TTC boyama analiz protokolü uygulandı.

3.8. Analizlerin Yapılması

3.8.1. TTC Boyama ile Beyin İnfarkt Alanının Analizi

TTC NADH, dehidrogenazlar ve diaforazlar ihtiva eden dokularda formazan pigmentlerini indirgeyen kristal yapılı bir kimyasal olup dehidrogenazların substratı olan bir redoks indikatörüdür. Suda kolayca çözünebilen ve normalde beyaz olan TTC, canlı hücrelerin mitokondrilerinde proton alıcısı rolü üstlenerek süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından 1,3,5-trifenil formazana indirgenir ve dokuya formazanın rengi olan kırmızı-pembe rengini verir. Canlılık aktivitelerini yitirmiş dokuların hücrelerinde ise dehidrogenaz enzimleri bozulduğundan TTC indirgeyemeyeceği ve doku boyanamayacağı için beyaz renkte kalır. Bu özelliği nedeniyle canlı ve cansız dokuların ayrımında TTC ile boyama yöntemi yaygın kullanılan yöntemlerdendir (181).

TTC analizi için alınan beyin dokuları kuru buz üzerinde donduruldu. Kesitler bregmanın 4 mm anterioru ve 6 mm posterioru aralığında koronal olarak 2 mm aralıklarla 6 dilim olacak şekilde alındı. Alınan kesitler, içerisinde fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile %1’lik konsantrasyonda hazırlanmış TTC bulunan petri kabına alındı. 37 °C’de 30 dakika süresince etüvde inkübe edildi. Akabinde beyin dilimleri %4’lük formaldehit ile 12 saat süresince fikse edildi (181, 182). Fiksasyonun ardından TTC ile boyanmış kesitlerin fotoğrafları çekildi ve görüntüler bilgisayara aktarıldı. İnfarkt alan yüzdesel olarak şu formülle hesaplandı:

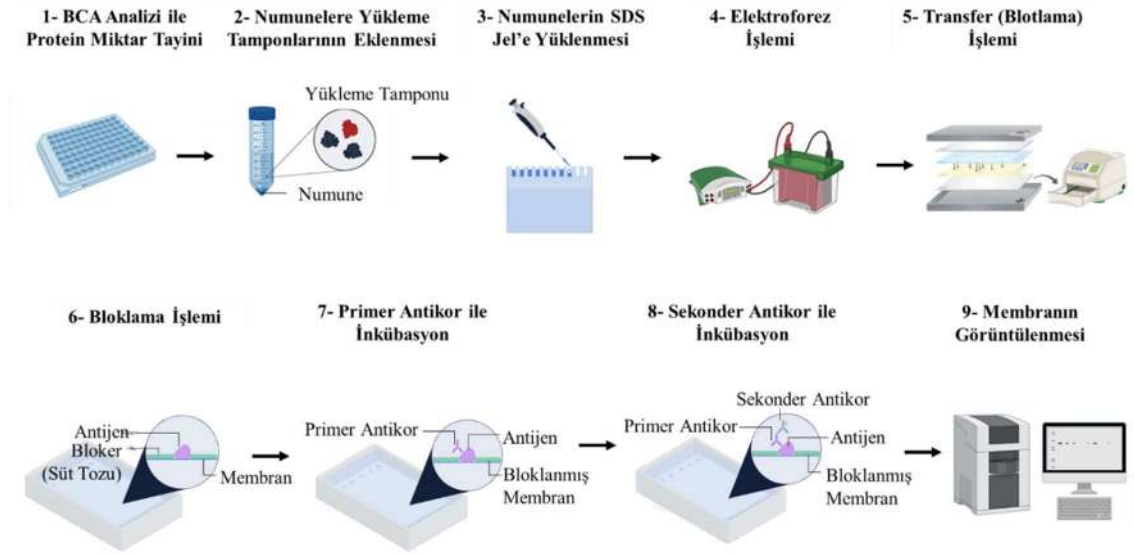


$$\%C = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Şekil 3. 10. İnfarkt alanın yüzdesel olarak hesaplanması (kontralateral hemisferdeki tüm alan (A), insipilateral hemisferdeki sağlıklı alan (B), infarkt alan (C))

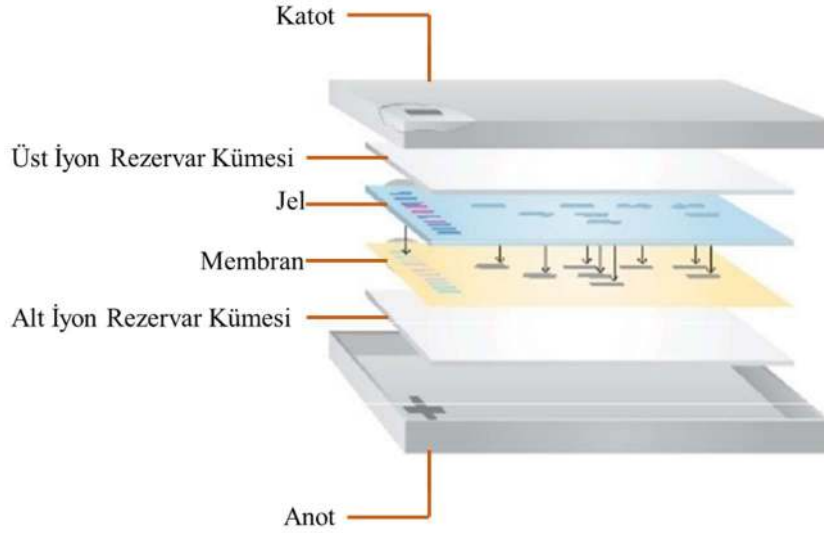
3.8.2. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik ve Otofajik Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi

Western Blot analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı. Sıçanların beyin dokularındaki apoptotik (BCL-2 ve BAX) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri Western Blot analizleri ile belirlendi. Yapılan Western Blot analizinin genel prosedürü Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 11. Western Blot analizine genel bakış

Alınan doku örnekleri RIPA Lysis Buffer (abcam, lot:GR3289972-20, UK) ve proteaz inhibitör kokteyl (abcam, lot:GR3251345-2) içerisinde homojenize edildi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Lizis sonrası 3 defa 10 sn sonikasyon yapıldı (Q125, QSonica, USA). Tüpler 4°C sıcaklıkta 15000 rpm’de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere alındı ve örneklerin protein düzeyleri BCA Protein ölçüm kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, lot:WB319447) kullanılarak belirlendi. Çalışmada %15 sodyum dodesil sülfat jeller kullanıldı ve her kuyucuğa eşit miktarda protein örneği (50 µg) yükledi. Jeller 10 dk 100 V’da daha sonra 70 dk 200 V’da yürütüldü. Elektroforez sonrası Trans-Blot Turbo RTA transfer kiti (Katalog No: 1704272, BioRad, ABD) kullanılarak 0.22 µm poli-vinili-den florür membranlara proteinler transfer edildi (TransBlot Turbo, BioRad, ABD) (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Western Blot membran transferi için hazırlanan sandviçin yapısı

Membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozuyla bloklandı ve sonra gece boyu 4 °C'de proteinlerin primer antikorları ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, membranlar 3 defa 5 dakika süreyle TBS-T ile yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat HRP ile konjüge edilmiş sekonder antikor uygulandı. İnkübasyondan sonra membranlar 3 defa 5 dk süreyle TBS-T ile yıkandı. Son olarak, ECL solüsyonu (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo-scientific, lot: YH374889) ile muamele edilen membranlar, Fusion FX-7 (Vilber, Almanya) sisteminde görüntülendi. Blotların analizi Image J programında analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak insan anti- β -aktin antikorunu kullanıldı. Deneyde ölçülen doku protein seviyesi β -aktin'e oranlandı.

3.9. İstatistiksel Analizler

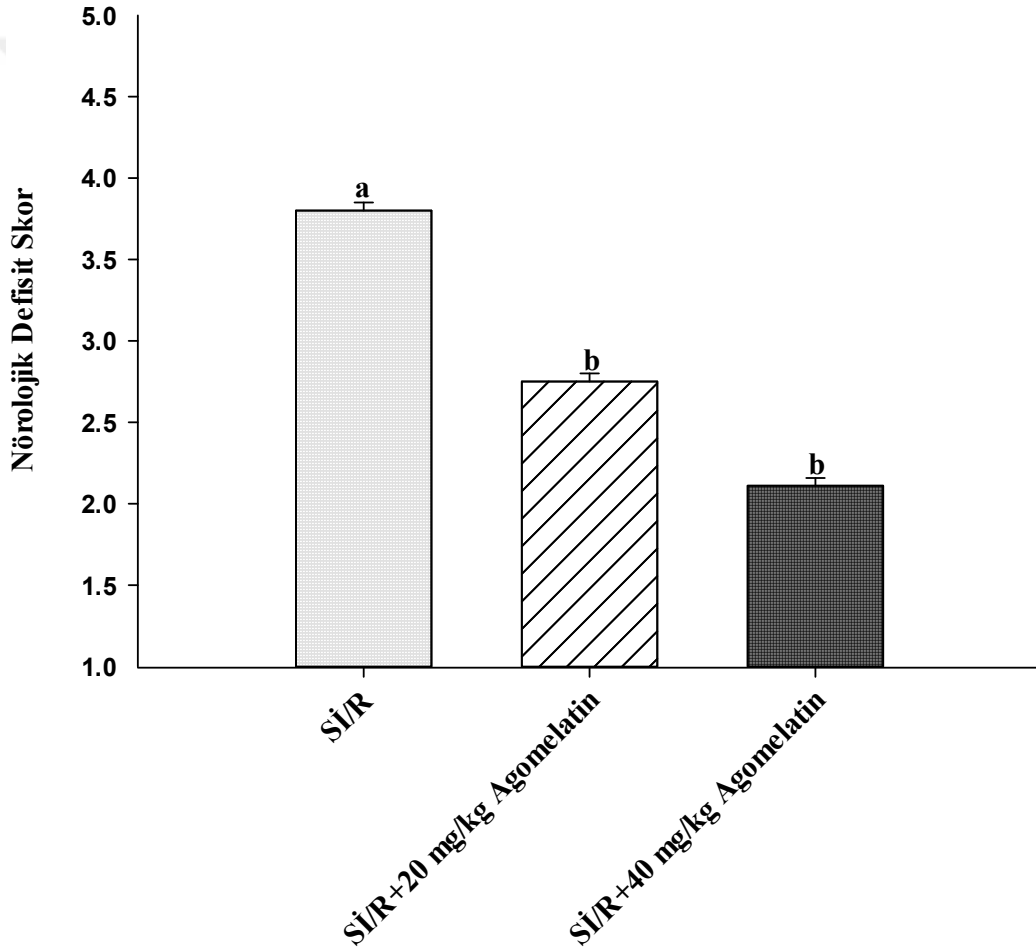
Çalışma sonunda elde edilen veriler IBM SPSS statistics version 24.0 for Windows paket programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel analiz sürecinde Shapiro Wilk testi kullanılarak elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Analizler Kruskal Wallis H testi ile yapıldı, gruplar arası karşılaştırmalarda önemli farklılık belirlendiğinde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Nicel veriler ortalama değer $\pm$ standart sapma ile özetlendi ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Agomelatinin NDS ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi

4.1.1. Agomelatinin NDS Üzerine Etkisi

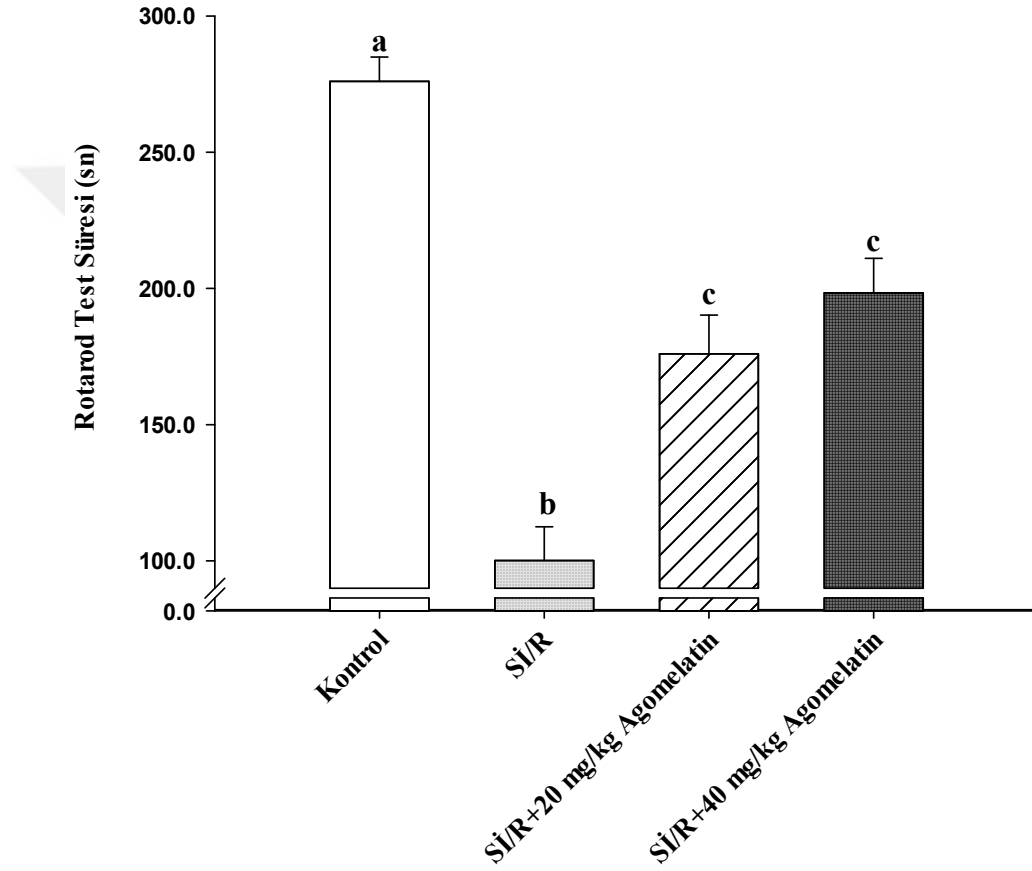
İntraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin Sİ/R modeli oluşturulan gruplarda NDS üzerine etkisi Şekil 4.1.'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu skorun Sİ/R grubuna göre Agomelatin uygulanan gruplarda düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4. 1. Agomelatinin NDS üzerine etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, ^{a,b} $p<0.05$).

4.1.2. Agomelatinin Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi

Sİ/R modeli oluşturulan sıçanlarda Agomelatinin rotarod test süresi üzerine etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu sürenin Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği ($p<0.05$), Agomelatin gruplarında ise bu sürenin Sİ/R grubuna göre arttığı belirlendi ($p<0.05$).

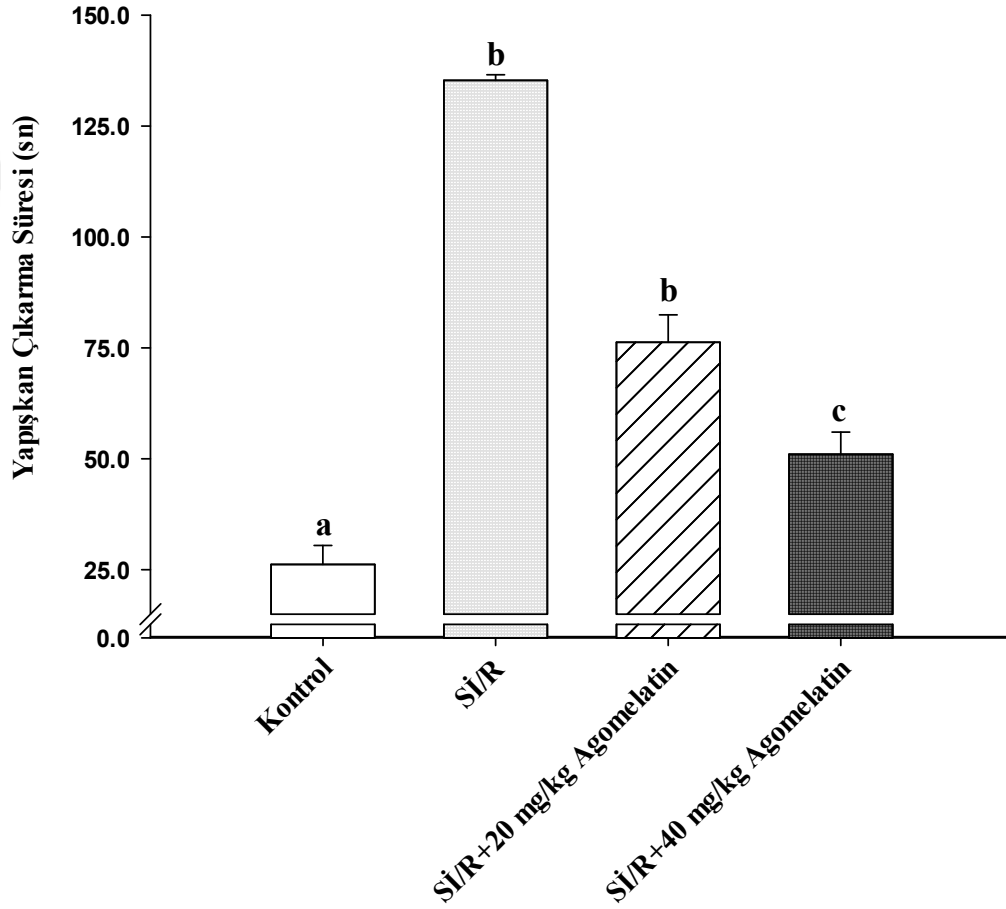


Şekil 4. 2. Agomelatinin rotarod test süresi üzerine etkisi (Verilerin değerlendirilmesi

Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$).

4.1.3. Agomelatinin Yapışkan Çıkarma Süresi Üzerine Etkisi

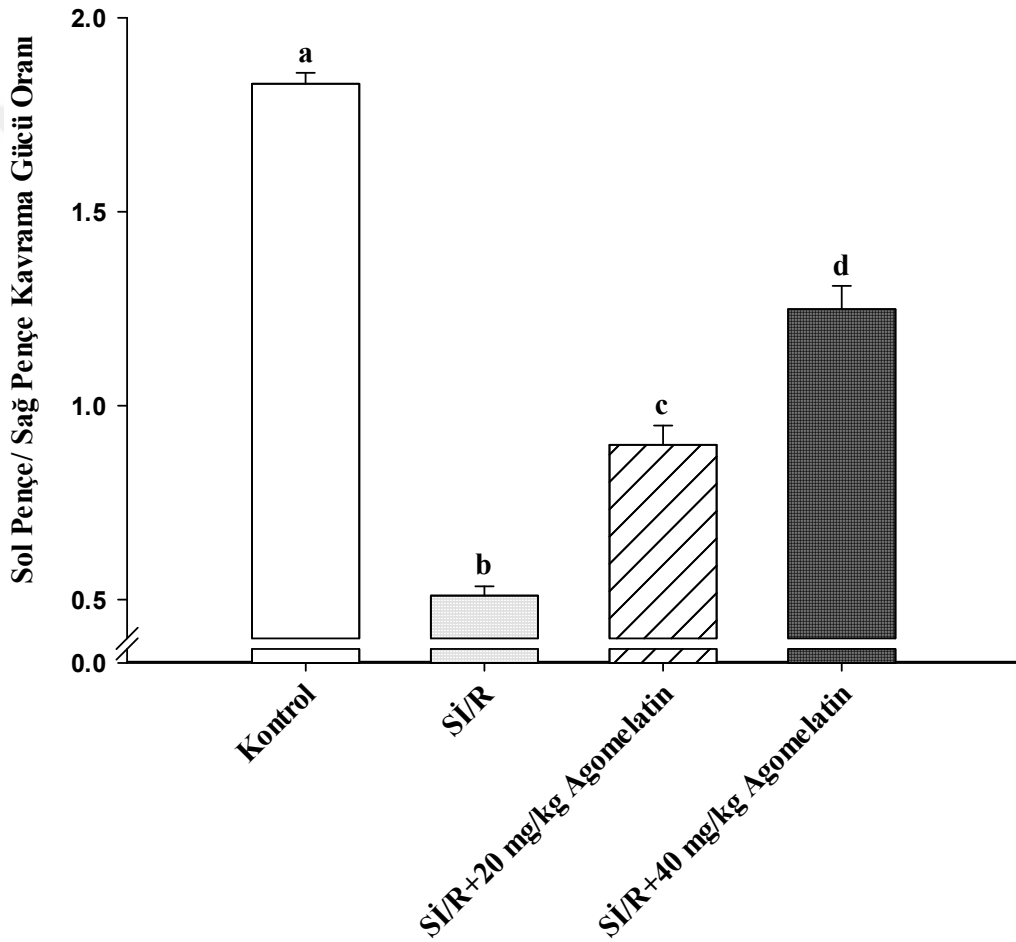
Agomelatin uygulamasının yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu sürenin Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak uzadığı ($p<0.05$), 40 mg/kg dozunda Agomelatin uygulanan grupta ise Sİ/R grubuna göre yapışkan çıkarma süresinin anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4. 3. Agomelatinin yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$).

4.1.4. Agomelatinin Kavrama Gücü Testi Üzerine Etkisi

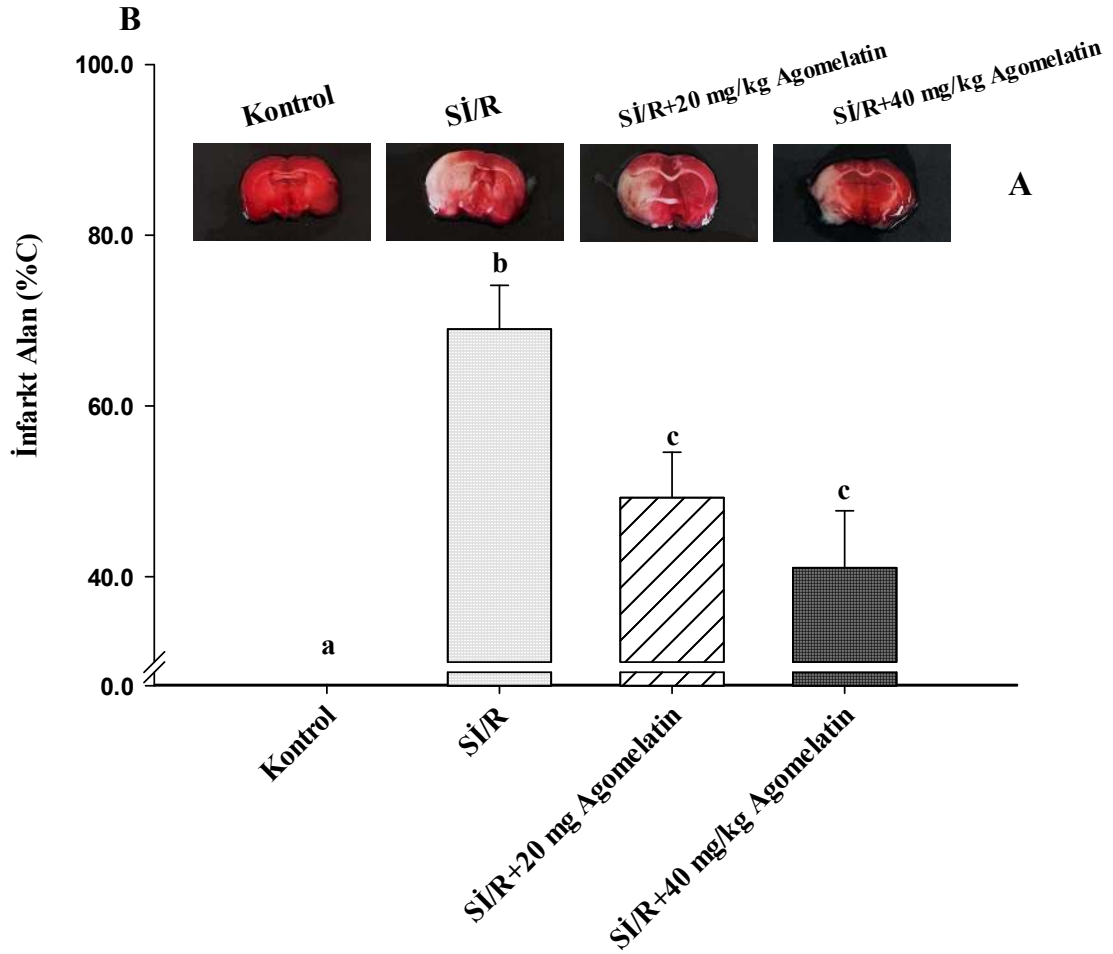
İntraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin kavrama gücü testi üzerine etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu test ile hesaplanan sol pençe/sağ pençe kavrama gücü oranı Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Agomelatin uygulanan gruplarda ise Sİ/R grubuna göre bu oranın arttığı ve bu artışın doz bağımlı olduğu yapılan istatistiksel analizler ile tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4. 4. Agomelatinin kavrama gücü (grip strenght) testi ile hesaplanan sol pençe/sağ pençe kavrama gücü oranı üzerine etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b, c ve d birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c,d p<0.05$).

4.2. Agomelatinin İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi

Agomelatinin Sİ/R nedenli oluşan infarkt alan yüzdesine etkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Kontrol grubunda Sİ/R modeli oluşturulmadığı için bu grupta infarkt alan gözlenmedi. Agomelatin uygulanan gruplarda Sİ/R grubuna göre infarkt alan yüzdesinin düşük olduğu ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).



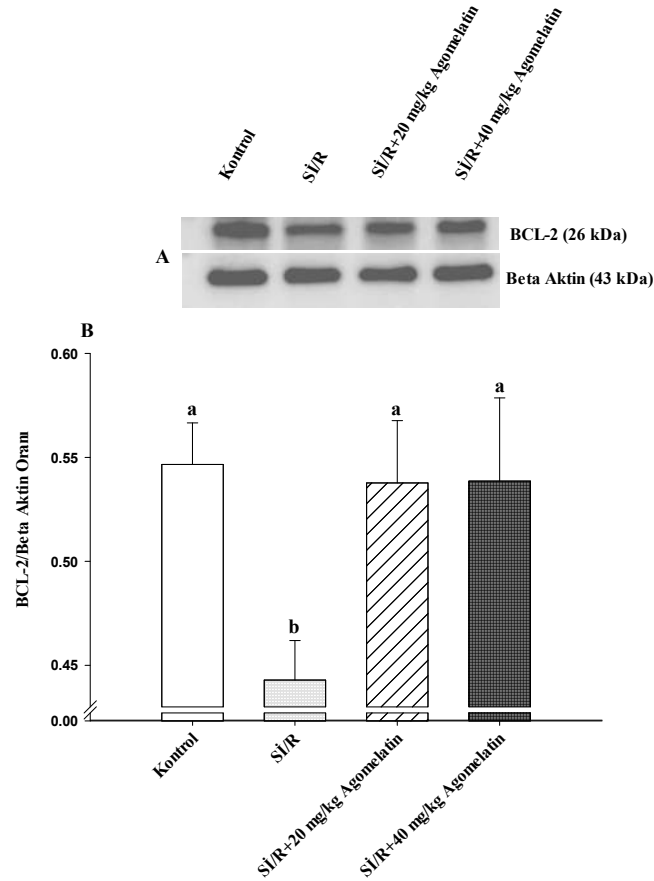
Şekil 4. 5. Agomelatinin İnfarkt Alan (%C) üzerine etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$).

4.3. Agomelatinin Apoptotik ve Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

4.3.1. Agomelatinin Apoptotik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

A. Agomelatinin BCL-2 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

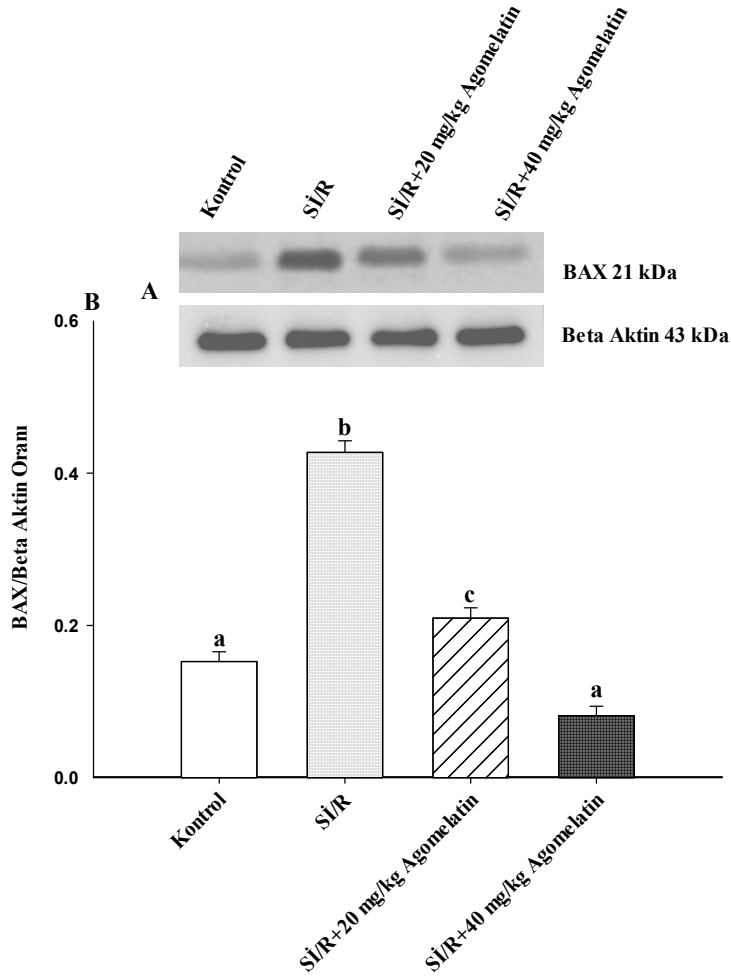
Şekil 4.6’da intraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin beyin dokusundaki BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi verilmiştir. Sİ/R grubunda bu seviye kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Agomelatin uygulanan gruplarda ise Sİ/R grubuna göre BCL-2 protein seviyesinin arttığı ($p<0.05$) ve artışın kontrol gruplarına yaklaştığı görüldü ($p>0.05$).



Şekil 4. 6. Agomelatinin BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve BCL-2 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b p<0.05$).

B. Agomelatinin BAX Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin beyin dokusundaki BAX protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.7’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Sİ/R grubunda bu seviye kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu ($p<0.05$), Agomelatin uygulanan gruplarda ise Sİ/R grubuna göre BAX protein seviyesinin düştüğü belirlendi ($p<0.05$).

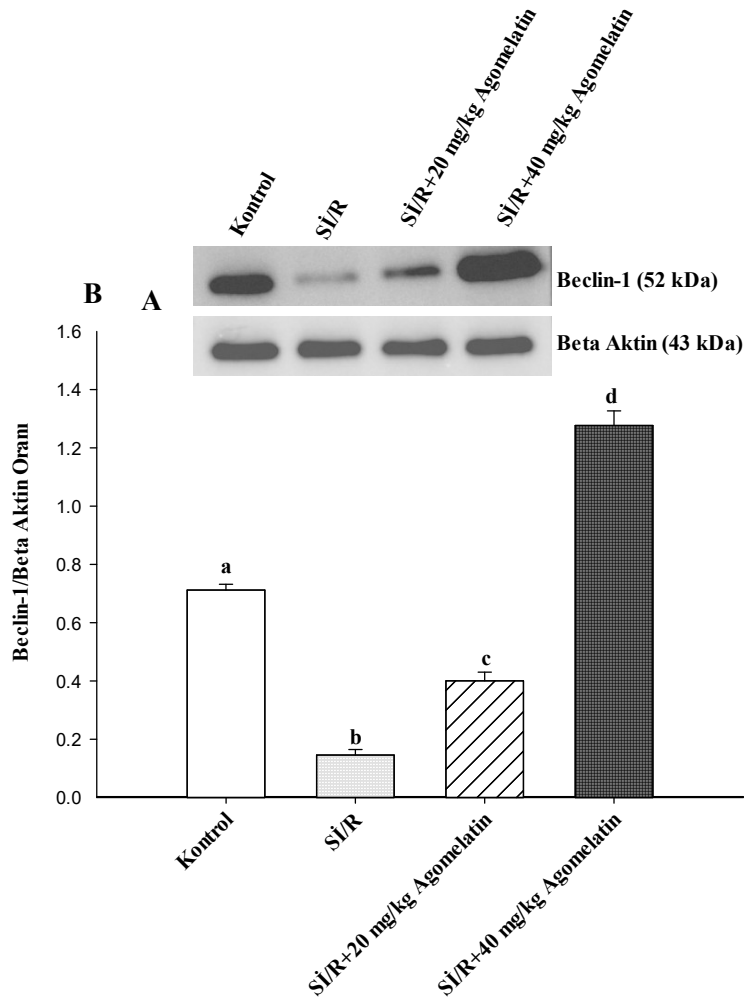


Şekil 4. 7. Agomelatinin BAX protein seviyesi üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve BAX bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$).

4.3.2. Agomelatinin Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

A. Agomelatinin Beclin-1 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

Şekil 4.8’de intraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin beyin dokusundaki Beclin-1 protein seviyesi üzerine etkisi verilmiştir. Sİ/R grubunda bu seviye kontrol grubuna göre daha düşük tespit edildi ($p<0.05$). Agomelatin uygulanan gruplarda ise Sİ/R grubuna göre Beclin-1 seviyesinin arttığı ve bu artışın doz bağımlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

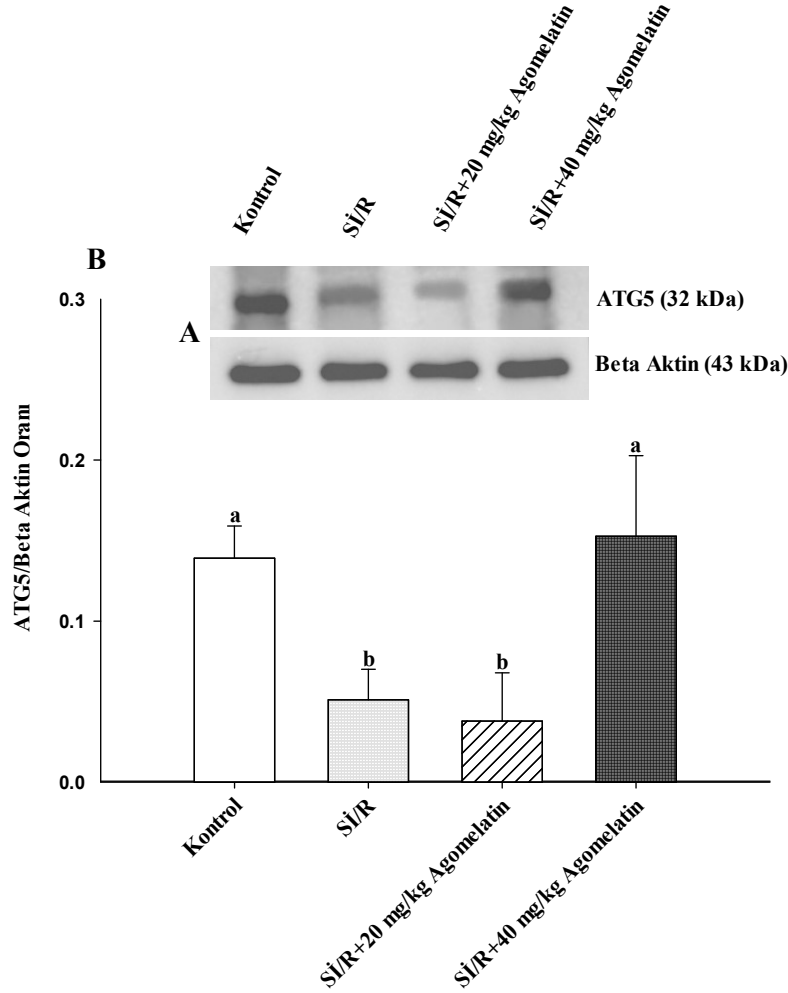


Şekil 4. 8. Agomelatinin Beclin-1 seviyeleri üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve Beclin-1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli

Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b, c ve d birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, $a,b,c,d p<0.05$).

B. Agomelatinin ATG5 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

Sİ/R modeli oluşturulan sıçanlarda Agomelatinin beyin dokusundaki ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4. 9’da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu Sİ/R grubunda ATG5 protein seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). 40 mg/kg Agomelatin uygulanan grupta ise Sİ/R grubuna göre ATG5 protein seviyesinin arttığı ($p<0.05$) ve bu artışın kontrol grubuna yakın seviyede olduğu tespit edildi ($p>0.05$).

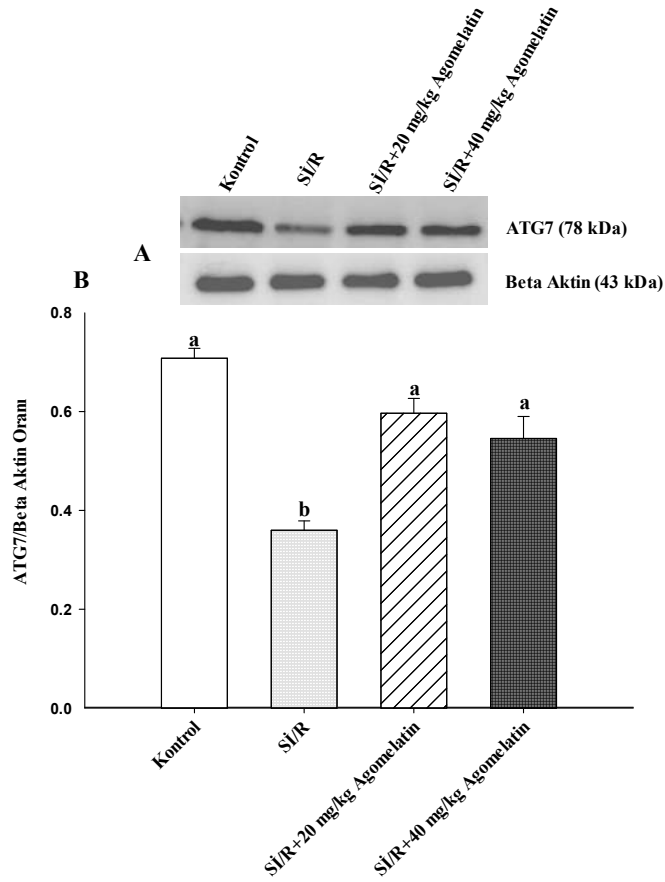


Şekil 4. 9. Agomelatinin ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve ATG5 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin

değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, ^{a,b}p<0.05).

C. Agomelatinin ATG7 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntraperitoneal olarak uygulanan Agomelatinin beyin dokusundaki ATG7 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.10'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler Sİ/R grubunda ATG7 protein seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu belirlendi (p<0.05). Agomelatin uygulanan gruplarda ise Sİ/R grubuna göre protein seviyelerini arttırdığı (p<0.05) ve bu artışın kontrole yakın olduğu tespit edildi (p>0.05).

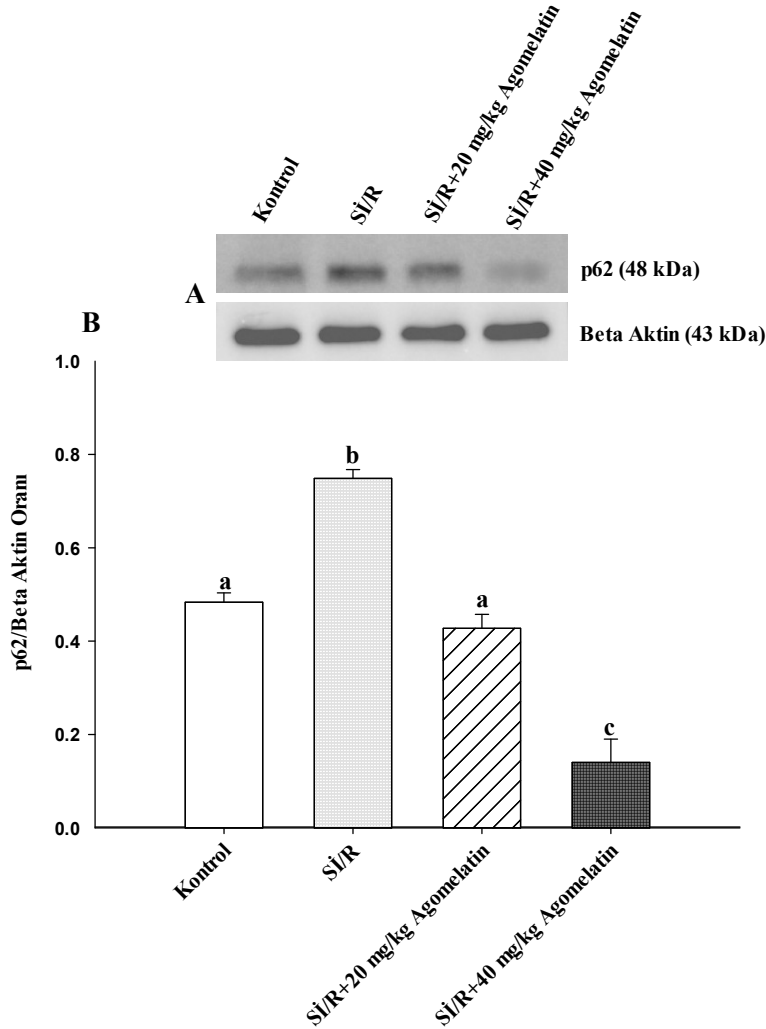


Şekil 4. 10. Agomelatinin ATG7 protein seviyesi üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve ATG7 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin

değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, ^{a,b}p<0.05).

D. Agomelatinin p62 Seviyeleri Üzerine Etkileri

Sİ/R modeli oluşturulan sıçanlarda Agomelatin uygulamasının beyin dokusundaki p62 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.11’de verilmiştir. Elde edilen bulgular Sİ/R grubunda p62 protein seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (p<0.05). Uygulanan Agomelatinin p62 protein seviyesini Sİ/R grubuna göre azalttığı ve bu azalmanın doz bağımlı olduğu görülmüştür (p<0.05).



Şekil 4. 11. Agomelatinin p62 protein seviyesi üzerine etkisi (Western Blot jel görüntüsü (A) ve p62 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B)). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir, ^{a,b,c}p<0.05).

5. TARTIŞMA

5.1. Agomelatinin Sİ/R Hasarında NDS, İnfarkt Alan ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi

Sİ/R beyne giden damarların tıkanmasıyla serebral kanlanmanın azalması ve/veya kesintiye uğraması sonucu gerçekleşen yoğun nöronal hasar ile karakterize patofizyolojik süreçtir. NDS, Sİ/R nedenli meydana gelen nörolojik bozuklukları inceleyen bir skorlama yöntemi olup bu yöntemde yaygın olarak Baderson skorlama metodu kullanılmaktadır. Bu yöntem ile hayvandaki Sİ/R hasarına bağlı olarak gelişen nörolojik bozukluklar ve yetersizlikler tespit edilebilmektedir (183). İnfarkt alan hesaplaması TTC boyama metoduyla dokudaki canlı ve cansız bölgelerin ayrımı ile cansız doku alanının tespiti esasına dayanıp Sİ/R'nin neden olduğu hasarın büyüklüğünü göstermektedir (181). Davranış testlerinden rotarod Sİ/R nedenli denge-motor koordinasyon kaybının (184), yapışkan çıkarma testi somatosensoriyel kaybın (185) ve kavrama gücü ise ön pençelerde kavrama gücü kaybının (186) değerlendirilmesini sağlayan yöntemlerdendir. Agomelatinin vücuttaki hem nöronal proliferasyonu, nörogenezi arttırıcı ve nöroinflamasyonu azaltıcı hem de Sİ/R nedenleri arasında yer alan metabolik parametreleri iyileştirici rolleri, Sİ/R hasarını hafifletebileceğini akla getirmektedir. Literatürde Agomelatinin Sİ/R üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Wijitra Chumboatong ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada Sİ/R modeli oluşturulmuş sıçanlarda Agomelatinin NDS'yi azalttığı sonucuna varılmıştır (42). Aynı çalışmada Agomelatinin Sİ/R nedenli infarkt alanı azalttığı tespit edilmiştir (42). Agomelatin ile agonist olan melatoninin Sİ/R hasarı üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da melatonin uygulamasının NDS'yi ve infarkt alanını azalttığı görülmüştür (27). Yapılan başka bir araştırmada ise Agomelatin ile agonist olan melatoninin Sİ/R nedenli infarkt alanı azalttığını ortaya koymuştur (187). Sandal S. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise melatoninin Sİ/R modelinde NDS'yi düşürdüğü ve infarkt alanı azalttığı görülmüştür (188). Yine aynı çalışmada melatoninin yapışkan çıkarma süresini azalttığı ve rotarod üzerinde kalma süresini uzattığı rapor edilmiştir (188). Nörodejeneratif bir hastalık olan Huntington hastalığı modeli oluşturulan ve Agomelatin

ile tedavi edilen sıçanlarda rotarod üzerinde durma süresinin uzadığı ve Agomelatinin nörodejeneratif motor koordinasyon bozukluğunu iyileştirdiği görülmüştür (189). Agomelatinin lokomotor aktivite üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada ise rotarod üzerinde kalma süresini uzattığı ve lokomotor aktiviteyi arttırdığı sonucu elde edilmiştir (190).

Mevcut literatür değerlendirildiğinde Agomelatinin Sİ/R'de NDS ve infarkt alanı azalttığı görülmektedir. Buna karşın Sİ/R hasarında Agomelatinin; somatosensoriyel ihmalin ölçüldüğü, kavrama gücü kaybının değerlendirildiği ve denge-motor koordinasyonun incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada Sİ/R modeli oluşturduğumuz sıçanlara Agomelatin uygulamasının NDS ve infarkt alanını literatürle paralel şekilde azalttığını tespit ettik. Ek olarak Sİ/R hasarında Agomelatinin yapışkan çıkarma süresi ile kavrama/güç kaybını azalttığını ve rotarod üzerinde kalma süresini uzattığını ilk defa rapor ettik. Sonuçlarımızı var olan çalışmalarla birlikte değerlendirdiğimizde Agomelatinin, Sİ/R kaynaklı nöronal hasar ile denge-motor koordinasyon, somatosensöriyel ve kavrama gücü kaybını iyileştirici etkileri olabileceği düşünülmektedir.

5.2. Agomelatinin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi

5.2.1. Agomelatinin Apoptoz Üzerine Etkisi

Apoptoz hücre çekirdeğinde büzüşme ve kromatin yoğunlaşması ile başlayan ve bunu sitoplazmada yoğunlaşmanın takip ettiği programlı hücre ölüm sürecidir (141). Bu süreçte rol alan sırasıyla anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerden olan BCL-2 ve BAX proteinleri öne çıkmaktadır (143, 144). Sİ/R sürecinde BCL-2 protein seviyesi düşerken BAX protein seviyesinde artış görülür. Bu durum Sİ/R sürecinde apoptotik aktivitenin artışına ve buna bağlı nöronal hasara neden olur (191). Agomelatinin ise BCL-2 protein seviyesini arttırıp BAX protein seviyesini azaltarak apoptozu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (175).

Literatür verileri incelendiğinde Sİ/R modeli oluşturulmuş sıçanlara Agomelatin uygulamasının, Sİ/R nedenli artan BAX protein seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışma apoptozda BCL-2 proteinine benzer şekilde anti-apoptotik rol oynayan ve Sİ/R'de azalan BCL-XL protein seviyesinin Agomelatin uygulaması ile arttığını göstermiştir. Yine bu çalışma ile pro-apoptotik olan ve Sİ/R'de artan Cas-3 protein seviyesinin Agomelatin uygulamasıyla düştüğü gösterilmiştir (42). Agomelatinin

apoptotik aktivitesinin nöronal PC-12 hücrelerinde incelendiği bir *in vitro* çalışmada ise Agomelatin uygulamasının pro-apoptotik Cas-3 ve Cas-9 protein seviyelerini azalttığı ortaya konmuştur (192). Hipokampüste endoplazmik retikulum stresi oluşturulan sıçanlarda da Agomelatinin BAX protein seviyelerini azaltıp; BCL-2 protein seviyelerini artırarak apoptozu inhibe ettiği rapor edilmiştir (193). Agomelatinin analogu olan melatoninin hipokampal BCL-2 protein seviyesinde ve BCL-2/BAX oranında önemli bir artışa neden olarak apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (194). Yine hipokampüste homosistein tarafından indüklenmiş apoptozu melatonin uygulamasının inhibe ettiği, melatonin uygulanan grupta BCL-2 protein seviyesinin arttığı ve BAX protein seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışma melatonin uygulamasıyla bu proteinlerin yanı sıra apoptozda BCL-2'ye benzer aktivite gösteren BCL-XL protein seviyelerinin arttığı ve apoptozda artış gösteren sitokrom-C, pro-Cas-3, pro-Cas-8 ve pro-Cas-9 protein seviyelerinin azaldığı sonuçlarını sunmuştur (195).

Mevcut literatür değerlendirildiğinde Agomelatinin BCL-2 protein seviyelerini artırarak, BAX protein seviyelerini azaltarak apoptozu inhibe edebileceği rapor edilmiştir. Sİ/R modeli oluşturduğumuz sıçanlara Agomelatin uygulaması ile elde ettiğimiz bulguların literatüre paralel olarak beyin dokusundaki BCL-2 protein seviyesini arttırdığını ve BAX protein seviyesini azalttığını gösterdik. Bulgularımız Agomelatinin apoptozu inhibe edici potansiyele sahip olabileceğini akla getirmektedir.

5.2.2 Agomelatinin Otofaji Üzerine Etkisi

Otofaji (Autophagy) kendi anlamına gelen “*auto*” ile yemek anlamındaki “*phagy*” sözcüklerinin birleşiminden olup hücrenin kendi kendini yemesi/sindirmesi olayını ifade etmekte kullanılır. (146). Oldukça kompleks olan bu süreçte rol alan proteinlerden Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62 proteinleri öne çıkmaktadır.

Otofajinin temel tetikleyicileri, Sİ/R patofizyolojisinde yer alan hücredeki hipoksik ortam, azalmış ATP düzeyleri ve mitokondriyal hasardır (148). Buna karşın hücrede otofajik süreç ile enerji üretiminin sağlanması ve hücre hasarının en aza indirilmesi amaçlanır (149). Dolayısıyla otofajinin Sİ/R patofizyolojisiyle tetiklenerek nöronal hasarı şiddetlendirici mi yoksa enerji üretiminin sağlanması yoluyla nöronal hasara karşı koruyucu mu olduğu henüz aydınlatılmamıştır (196).

Yapılan bir çalışmada ATG7 yoksunu farelerde otofaji kaybına bağlı olarak nörodejenerasyonun meydana geldiği gösterilmiştir (197). Benzer şekilde yapılan farklı

bir çalışmada ise ATG5 nakavt farelerde nörodejeneratif bozuklukların geliştiği ve bu bozukluğun otofaji baskılanması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (198). Başka bir çalışma ile otofajinin uyarılmasının nöroprotektif etkinlik göstererek spinal kord hasarını azaltılabileceği bildirilmiştir (199). Bu çalışmalar otofajik aktivitedeki artışın Sİ/R'nin neden olduğu nöronal hasarı hafifletebileceğini düşündürmektedir. Guo H, ve ark. Tarafından OSAO modeli oluşturulan farelerde uzaktan ekstremitte iskemik ardkoşullama yapılarak iskemik hasarın azaltılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tedavi grubunda Beclin-1 ile ATG7 protein seviyelerinin arttığı ve p62 protein seviyeleri ile infarkt alanın azaldığı görülmüştür (200). Sİ/R hasarındaki otofajik seyri inceleyen başka bir çalışma ise infarkt alandaki kor ve penumbral bölgeyi ayrı olarak ele almış, otofajik aktiviteyi arttıran Beclin-1 ve LC3 protein seviyelerinin penumbral bölgede kor bölgesine göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada rapamisin uygulaması ile tedavi edilen grupta da bu iki otofajik protein seviyesinin arttığı ve Sİ/R nedenli infarkt alanın azaldığı gösterilmiştir (201).

Agomelatinin otofajik aktiviteye etkisi ile ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında ise kronik strese maruz bırakılmış farelerde hipokampal Beclin-1 ile LC3-I protein seviyelerini arttırdığı ve p62 protein seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (202). Başka bir çalışmada Agomelatinin U87GM ve A172 glioblastoma hücrelerinde, otofajik süreçte rol alan Beclin-1 ve LC3-II protein seviyelerini arttırdığı görülmüştür. Agomelatinin agonisti melatoninin de incelendiği aynı çalışmada melatoninin benzer etkilerle otofajiyi indüklediği rapor edilmiştir (203). Melatoninin hidrojen peroksit kaynaklı hasar üzerine etkisinin incelendiği bir *in vitro* çalışmada melatonin uygulamasının HT22 hipokampal hücrelerinde Beclin-1, LC-3B ve ATG5 protein seviyelerini arttırıp p62 protein seviyesini azalttığı belirlenmiştir (204). Melatoninin Sİ/R oluşturulmuş sıçanlarda ise beyin dokusundaki LC3-I/II oranını ve LC3 ile Beclin-1 protein seviyesini arttırarak p62 protein seviyesini azalttığı ve böylelikle Sİ/R hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (188). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde Agomelatin agonisti olan melatoninin Sİ/R hasarında otofajik süreçlerde rol oynayabileceği gösterilmişken Agomelatinin bu süreçte nasıl etki/etkiler göstereceği hala gizemini korumaktadır.

Yaptığımız çalışma ile Agomelatin uygulamasının Sİ/R'de Beclin-1, ATG5 ve ATG7 protein seviyelerini arttırdığını ve p62 protein seviyesini azaltarak otofajik aktiviteyi desteklediğini belirledik. Otofajik aktivitedeki bu indüksiyon bizlere Agomelatinin infarkt alandaki hücresel aktivitenin fazla olduğu penumbral bölgeyi

arttırmasından ve/veya kor bölgesini azaltmasından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Özetle bu çalışmanın sonuçları Agomelatinin, Sİ/R nedeniyle azalmış otofajiyi indükleyerek Sİ/R hasarını iyileştirici etkileri olabileceğini düşündüren kritik ön kanıtlar sunmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sürecinde yapılan testlerde elde edilen bulgulara göre Agomelatin gruplarında rotarod üzerinde kalma süresinin daha uzun, etiket çıkarma sürelerinin daha kısa olduğu ve kavrama güç oranının da daha yüksek olduğu görüldü. Sonuçlarımız Agomelatinin Sİ/R nedenli bozulmuş motor koordinasyonu ile somatosensöriyel ihmali ve güç kaybını iyileştirdiğini ve Sİ/R etkisiyle oluşan infarkt alanı azalttığını gösterdi. Western Blot analizi ile Agomelatinin apoptozda rol alan BCL-2 protein seviyesini arttırdığı ve BAX protein seviyesini azalttığı sonucu elde edildi. Bu sonuç Agomelatinin Sİ/R hasarı nedenli apoptozu inhibe edebileceğini düşündürdü. Agomelatinin otofajik süreçte aktivite gösteren protein seviyelerine etkisi analiz edildiğinde Beclin-1, ATG5 ve ATG7 proteinlerin seviyelerini arttırdığı, p62 protein seviyesini azalttığını belirledik. Otofajik protein seviyelerindeki bu değişim Sİ/R modeli oluşturulmuş sıçanlarda Agomelatin uygulamasının otofajiyi indükleyebileceğini akla getirdi.

Sİ/R oldukça karmaşık patofizyolojiye sahip bir süreç olduğundan Agomelatinin Sİ/R’de terapötik etkinliği birçok faktörle ilişkili olabilmektedir. Dolayısıyla söz konusu etkinliğin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda Agomelatinin daha farklı dozlarda ve farklı uygulama yöntemleri kullanılarak Sİ/R hasarı üzerine etkisinin incelenmesi literatürdeki boşluklara katkı sağlayabilecektir. Bununla beraber farklı R süreleri üzerindeki rolünün incelenmesi de Agomelatinin iskemik inme seyrindeki etkisi ile ilgili soru işaretlerini azaltabilecektir. Agomelatin ile tedavinin Sİ/R hasarındaki apoptotik süreçte rol oynayan hücresel yollar üzerine etkisinin incelenmesi de ileride yapılacak çalışmalarla literatüre bu konuda katkı sağlayacaktır. Agomelatinin Sİ/R hasarında meydana gelen otofaji üzerine etkisi hala gizemini korumaktadır. Agomelatin uygulamasının Sİ/R’deki otofajik süreç dahil moleküler mekanizmaların incelendiği daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Rawat A. Potential Biomarkers in Stroke and Current. *Int J Life Sci Scienti Res.* 2015,2(4).
2. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the American Heart Association. *J Circulation.* 2022,145(8):e153-e639.
3. Mathers C, Stevens G, Hogan D, Mahanani WR, Ho J. Global and regional causes of death: patterns and trends, 2000–15. *J Disease Control Priorities: Improving Health Reducing Poverty 3rd edition.* 2017.
4. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, Aboyans V, Adetokunboh O, Afshin A, Agrawal A. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *%J The lancet* 2017,390(10100):1151-210.
5. Collaborators GLRoS. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *J New England Journal of Medicine.* 2018,379(25):2429-37.
6. Cimarosti H, Henley JM. Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *J The Neuroscientist.* 2008,14(6):626-36.
7. Aronowski J, Strong R, Grotta JC, Metabolism. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Journal of Cerebral Blood Flow.* 1997,17(10):1048-56.
8. Yang G-Y, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Stroke.* 1994,25(8):1658-64.
9. Baue AE, McClerkin WW. A study of shock acidosis and the declamping phenomenon. *J Annals of Surgery.* 1965,161(1):41.
10. Vetto RM, Brant B. Control of declamping shock. *J The American Journal of Surgery* 1968,116(2):273-9.
11. Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *J Stroke.* 1999,30(1):93-9.

12. Astrup J, Symon L, Branston N, Lassen N. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *J Stroke*. 1977,8(1):51-7.
13. Guo J, Zheng H-B, Duan J-C, He L, Chen N, Gong Q-Y, Tang H-H, Li H-X, Wang L, Cheng J-Q. Diffusion tensor MRI for the assessment of cerebral ischemia/reperfusion injury in the penumbra of non-human primate stroke model. *J Neurological research*. 2011,33(1):108-12.
14. Huang H, Chen Y-M, Zhu F, Tang S-T, Xiao J-D, Li L-L, Lin X-J. Down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase activity in ischemic penumbra after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J International journal of clinical experimental pathology*. 2015,8(10):12708.
15. Zhao G, Zhang W, Li L, Wu S, Du G. Pinocembrin protects the brain against ischemia-reperfusion injury and reverses the autophagy dysfunction in the penumbra area. *J Molecules*. 2014,19(10):15786-98.
16. Zeng M, Zhou H, He Y, Wang Z, Shao C, Yin J, Du H, Yang J, Wan H. Danhong injection alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by improving intracellular energy metabolism coupling in the ischemic penumbra. *J Biomedicine Pharmacotherapy*. 2021,140:111771.
17. Yihao D, Tao G, Zhiyuan W, Xiaoming Z, Lingling D, Hongyun H. Ginkgo biloba leaf extract (EGb-761) elicits neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by enhancement of autophagy flux in neurons in the penumbra. *J Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021,24(8):1138.
18. Deng Y-h, He H-y, Yang L-q, Zhang P-y. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *J Neural Regeneration Research*. 2016,11(7):1108.
19. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J The Journal of cell biology*. 1967,33(2):437-49.
20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *J British journal of cancer*. 1972,26(4):239-57.
21. Yu S, Wu K, Liang Y, Zhang H, Guo C, Yang B. Therapeutic targets and molecular mechanism of calycosin for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Aging*. 2021,13(12):16804.

22. Tramacere I, Boncoraglio GB, Banzi R, Del Giovane C, Kwag KH, Squizzato A, Moja L. Comparison of statins for secondary prevention in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and network meta-analysis. *J BMC medicine* 2019,17(1):1-12.
23. Beez T, Steiger H-J, Etminan N. Pharmacological targeting of secondary brain damage following ischemic or hemorrhagic stroke, traumatic brain injury, and bacterial meningitis-a systematic review and meta-analysis. *J BMC neurology*. 2017,17(1):1-12.
24. Chen L, Zhang G, Khan AA, Guo X, Gu Y. Clinical efficacy and meta-analysis of stem cell therapies for patients with brain ischemia. *J Stem cells international*. 2016,2016.
25. Chen B, Liao W-Q, Xu N, Xu H, Wen J-Y, Yu C-A, Liu X-Y, Li C-L, Zhao S-M, Campbell W. Adiponectin protects against cerebral ischemia–reperfusion injury through anti-inflammatory action. *J Brain research*. 2009,1273:129-37.
26. Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, Liang X, Zhu G, Xu Z. Neuroprotective effect of curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation. *J Journal of Molecular Neuroscience*. 2018,64(1):129-39.
27. Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR, Gupta YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *J European journal of pharmacology*. 2001,428(2):185-92.
28. Liu L, Chen H, Jin J, Tang Z, Yin P, Zhong D, Li G. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation. *J Life sciences*. 2019,239:117036.
29. Sutherland ER, Martin RJ, Ellison MC, Kraft M. Immunomodulatory effects of melatonin in asthma. *J American journal of respiratory critical care medicine*. 2002,166(8):1055-61.
30. Sulli A, Maestroni G, Villaggio B, Hertens E, Craviotto C, Pizzorni C, Briata M, Serio B, Cutolo M. Melatonin serum levels in rheumatoid arthritis. *J Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002,966(1):276-83.
31. Manev H, Uz T, Kharlamov A, Cagnoli C, Franceschini D, Giusti P. In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin:

- effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. *J Restorative neurology neuroscience*. 1996,9(4):251-6.
32. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *J Pediatric research*. 2001,50(6):756-60.
 33. Purushothaman A, Sheeja AA, Janardanan D. Hydroxyl radical scavenging activity of melatonin and its related indolamines. *J Free Radical Research*. 2020,54(5):373-83.
 34. Reina M, Martínez A. A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK). *J Computational Theoretical Chemistry*. 2018,1123:111-8.
 35. Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, Garcia L, Acuña-Castroviejo D. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Journal of pineal research*. 2009,47(2):192-200.
 36. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Journal of pineal research*. 2008,44(2):157-64.
 37. Zhi S, Fang G, Xie X, Liu L, Yan J, Liu D, Yu H. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling. *J Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020,24(3):1524-36.
 38. Ali T, Rahman SU, Hao Q, Li W, Liu Z, Ali Shah F, Murtaza I, Zhang Z, Yang X, Liu G. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation. *J Journal of pineal research*. 2020,69(2):e12667.
 39. Cankara FN, Günaydin C, Çelik ZB, Şahin Y, Pekgöz Ş, Erzurumlu Y, Gülle K. Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity. *J Metabolic Brain Disease*. 2021,36(2):339-49.
 40. El-Khatib YA, Sayed RH, Sallam NA, Zaki HF, Khattab MM. 17 β -Estradiol augments the neuroprotective effect of agomelatine in depressive-and anxiety-like behaviors in ovariectomized rats. *J Psychopharmacology*. 2020,237(9):2873-86.
 41. Savran M, Aslankoç R, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Temel EN, Kosar P, Boztepe S. Agomelatine could prevent brain and cerebellum injury against LPS-induced neuroinflammation in rats. *J Cytokine*. 2020,127:154957.

42. Chumboatong W, Thummayot S, Govitrapong P, Tocharus C, Jittiwat J, Tocharus J. Neuroprotection of agomelatine against cerebral ischemia/reperfusion injury through an antiapoptotic pathway in rat. *J Neurochemistry international*. 2017,102:114-22.
43. Chumboatong W, Khamchai S, Tocharus C, Govitrapong P, Tocharus J. Agomelatine protects against permanent cerebral ischaemia via the Nrf2-HO-1 pathway. *J European journal of pharmacology*. 2020,874:173028.
44. Chumboatong W, Khamchai S, Tocharus C, Govitrapong P, Tocharus J. Agomelatine exerts an anti-inflammatory effect by inhibiting microglial activation through TLR4/NLRP3 pathway in pMCAO Rats. *J Neurotoxicity Research*. 2022,40(1):259-66.
45. Smith KJ, Ainslie PN. Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise. *J Experimental physiology*. 2017,102(11):1356-71.
46. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *J Nature*. 2010,468(7321):232-43.
47. Şahan M, SATAR S, KOÇ AF, Ahmet S. İskemik inme ve akut faz reaktanları. *J Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010,19(2):85-140.
48. Maldonado KA, Alsayouri K. Physiology, Brain. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2021.
49. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *J Trends in neurosciences*. 2013,36(10):587-97.
50. Dhar R, Diringer M. Cerebral Blood Flow Physiology and Metabolism in the Neurocritical Care Unit. In M. Torbey (Ed.). *Neurocritical Care* 2019:11-8.
51. Shah RS, Jeyaretna DS. Cerebral vascular anatomy and physiology. *J Surgery*. 2018,36(11):606-12.
52. Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Journal of Experimental Biology*. 2004,207(18):3171-88.
53. Tan A, Roberts D. Cerebral circulation 1: anatomy. *J BJA education*. 2021,21(10):390-5.
54. Pearce J. The circle of Willis (1621–75). *J Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*. 2000,69(1):86-.

55. Uston C. NEUROwords Dr. Thomas Willis' Famous Eponym: The Circle of Willis. *J Journal of the History of the Neurosciences*. 2005,14(1):16-21.
56. Hartkamp MJ, van der Grond J, van Everdingen KJ, Hillen B, Mali WP. Circle of Willis collateral flow investigated by magnetic resonance angiography. *J Stroke*. 1999,30(12):2671-8.
57. Karatas A, Coban G, Cinar C, Oran I, Uz A. Assessment of the circle of Willis with cranial tomography angiography. *J Medical science monitor: international medical journal of experimental clinical research*. 2015,21:2647.
58. Valentinuzzi ME, Díaz R. The Brain Willis Circle and Ring Electric Power Systems: Analogies [Retrospectroscope]. *J IEEE pulse*. 2018,9(1):40-5.
59. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *J Pharmacology therapeutics*. 1995,66(1):149-73.
60. Mamo YA. Cerebrovascular effects of vasoactive drugs: University of Melbourne; 2015.
61. Abiodun A. Stroke (Cerebrovascular Accident (CVA) or brain attack) and its management-Literature review. *J Int J Innov Healthc Res*. 2018,6:1-9.
62. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors J, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *J Stroke*. 2013,44(7):2064-89.
63. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *J Bulletin of the World Health Organization*. 1980,58(1):113.
64. Investigators WMPP. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Journal of clinical epidemiology*. 1988,41(2):105-14.
65. Kamp M, Tahsim-Oglou Y, Steiger H-J, Hänggi D. Traumatic brain injuries in the ancient Egypt: insights from the Edwin Smith Papyrus. *J Journal of Neurological Surgery Part A: Central European Neurosurgery*. 2012,73(04):230-7.
66. Breitenfeld T, Jurasic M, Breitenfeld D. Hippocrates: the forefather of neurology. *J Neurological Sciences*. 2014,35(9):1349-52.

67. Robicsek F, Roush T, Cook J, Reames M. From Hippocrates to Palmaz-Schatz, the history of carotid surgery. *J European journal of vascular endovascular surgery*. 2004,27(4):389-97.
68. Williams AN. Thomas Willis' understanding of cerebrovascular disorders. *J Journal of Stroke Cerebrovascular Diseases*. 2003,12(6):280-4.
69. Walusinski O. Charcot and cholesterin. *J European Neurology*. 2019,81(5-6):309-18.
70. Arboix A, Fabregas M, Martí-Vilalta J. Stroke in the late 19th and early 20th centuries: a clinical and therapeutic review. *J Neurosci Hist*. 2013,1(1):6-11.
71. Neuman MR, Baura GD, Meldrum S, Soykan O, Valentinuzzi ME, Leder RS, Micera S, Zhang Y-T. Advances in medical devices and medical electronics. *J Proceedings of the IEEE*. 2012,100(Special Centennial Issue):1537-50.
72. Martinez HR, Rangel-Guerra RA, Marfil LJ. Ischemic stroke due to deficiency of coagulation inhibitors. Report of 10 young adults. *J Stroke*. 1993,24(1):19-25.
73. Takano K, Yamaguchi T, Kato H, Omae T. Activation of coagulation in acute cardioembolic stroke. *J Stroke*. 1991,22(1):12-6.
74. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *J British journal of haematology*. 2008,141(6):757-63.
75. Gómez-Outes A, Luisa Suarez-Gea M, Calvo-Rojas G, Lecumberri R, Rocha E, Pozo-Hernández C, Isabel Terleira-Fernandez A, Vargas-Castrillón E. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. *J Current drug discovery technologies*. 2012,9(2):83-104.
76. Lapchak PA. Development of thrombolytic therapy for stroke: a perspective. *J Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2002,11(11):1623-32.
77. Ouriel K. A history of thrombolytic therapy. *J Journal of Endovascular Therapy*. 2004,11(6_suppl):II-128-II-33.
78. Kang D-H, Park J. Endovascular stroke therapy focused on stent retriever thrombectomy and direct clot aspiration: historical review and modern application. *J Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2017,60(3):335-47.
79. Spiotta AM, Chaudry MI, Hui FK, Turner RD, Kellogg RT, Turk AS. Evolution of thrombectomy approaches and devices for acute stroke: a technical review. *J Journal of neurointerventional surgery*. 2015,7(1):2-7.
80. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CA, Arora P, Avery CL, Baker-Smith CM, Beaton AZ, Boehme AK, Buxton AE. Heart Disease and stroke

- statistics—2023 update: a report from the American Heart Association. *J Circulation*. 2023,147(8):e93-e621.
81. Thayabaranathan T, Kim J, Cadilhac DA, Thrift AG, Donnan GA, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin V, Norrving B. Global stroke statistics 2022. *J International Journal of Stroke*. 2022,17(9):946-56.
 82. Kim J, Thayabaranathan T, Donnan GA, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin V, Norrving B, Owolabi M, Pandian J. Global stroke statistics 2019. *J International Journal of Stroke*. 2020,15(8):819-38.
 83. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammersgaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *J Stroke*. 2009,40(6):2068-72.
 84. Montaña A, Hanley DF, Hemphill III JC. Hemorrhagic stroke. *J Handbook of clinical neurology*. 2021,176:229-48.
 85. Unnithan AKA, Mehta P. Hemorrhagic stroke 2020.
 86. Hanel RA, Xavier AR, Mohammad Y, Kirmani JF, Yahia AM, Qureshi AI. Outcome following intracerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage. *J Neurological research*. 2002,24(sup1):58-62.
 87. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Miller R, Huster G. Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *J Journal of neurosurgery*. 1993,78(2):188-91.
 88. Randolph SA, Safety. Ischemic stroke. *J Workplace Health*. 2016,64(9):444-.
 89. Trousseau A. Lectures on clinical medicine: Lindsay & Blakiston; 1873.
 90. Barr JD. Cerebral angiography in the assessment of acute cerebral ischemia: guidelines and recommendations. *J Journal of vascular interventional radiology*. 2004,15(1):S57-S66.
 91. Geocadin R, Ghodadra R, Kimura T, Lei H, Sherman D, Hanley D, Thakor N. A novel quantitative EEG injury measure of global cerebral ischemia. *J Clinical Neurophysiology*. 2000,111(10):1779-87.
 92. Vilela P, Rowley HA. Brain ischemia: CT and MRI techniques in acute ischemic stroke. *J European journal of radiology*. 2017,96:162-72.
 93. Bonneville F. Imaging of cerebral venous thrombosis. *J Diagnostic Interventional Imaging*. 2014,95(12):1145-50.
 94. Ghoneim A, Straiton J, Pollard C, Macdonald K, Jampana R. Imaging of cerebral venous thrombosis. *J Clinical radiology*. 2020,75(4):254-64.

95. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR. Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. *J Circulation*. 2019,139(10):e56-e528.
96. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN. Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association. *J Circulation*. 2020,141(9):e139-e596.
97. Gibson CL. Cerebral ischemic stroke: is gender important? *J Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2013,33(9):1355-61.
98. Lisabeth L, Bushnell C. Stroke risk in women: the role of menopause and hormone therapy. *J The Lancet Neurology*. 2012,11(1):82-91.
99. Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. *J Translational stroke research*. 2013,4:390-401.
100. Ding Q, Liu S, Yao Y, Liu H, Cai T, Han L. Global, regional, and national burden of ischemic stroke, 1990–2019. *J Neurology*. 2022,98(3):e279-e90.
101. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Cheng S, Delling FN. Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. *J Circulation*. 2021,143(8):e254-e743.
102. O'donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *J The Lancet*. 2010,376(9735):112-23.
103. Yousufuddin M, Young N. Aging and ischemic stroke. *J Aging*. 2019,11(9):2542.
104. Lucke-Wold BP, Turner RC, Lucke-Wold AN, Rosen CL, Huber JD. Age and the metabolic syndrome as risk factors for ischemic stroke: improving preclinical models of ischemic stroke. *J The Yale journal of biology medicine*. 2012,85(4):523.
105. Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Age and sex are critical factors in ischemic stroke pathology. *J Endocrinology*. 2018,159(8):3120-31.
106. Gardener H, Sacco RL, Rundek T, Battistella V, Cheung YK, Elkind MS. Race and ethnic disparities in stroke incidence in the Northern Manhattan Study. *J Stroke*. 2020,51(4):1064-9.

107. Kissela B, Schneider A, Kleindorfer D, Khoury J, Miller R, Alwell K, Woo D, Szaflarski J, Gebel J, Moomaw C. Stroke in a biracial population: the excess burden of stroke among blacks. *J Stroke*. 2004;35(2):426-31.
108. Ghafoor A, Ghazanfar A, Sarfraz M, Ashraf SJ. Frequency of Dyslipidemia in Ischemic Strokes Involving Different Regions of Brain. *J Pakistan Journal of Medical Health Sciences*. 2023;17(02):91-.
109. Zheng S, Yao B. Impact of risk factors for recurrence after the first ischemic stroke in adults: A systematic review and meta-analysis. *J Journal of Clinical Neuroscience*. 2019;60:24-30.
110. Murphy SJ, Werring DJ. Stroke: causes and clinical features. *J Medicine*. 2020;48(9):561-6.
111. Takahashi I, Geyer SM, Nishi N, Ohshita T, Takahashi T, Akahoshi M, Fujiwara S, Kodama K, Matsumoto M. Lifetime risk of stroke and impact of hypertension: estimates from the adult health study in Hiroshima and Nagasaki. *J Hypertension Research*. 2011;34(5):649-54.
112. Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan S-L. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2018;38(12):2129-49.
113. Wajngarten M, Silva GS. Hypertension and stroke: update on treatment. *J European Cardiology Review*. 2019;14(2):111.
114. Banerjee C, Moon YP, Paik MC, Rundek T, Mora-McLaughlin C, Vieira JR, Sacco RL, Elkind MS. Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *J Stroke*. 2012;43(5):1212-7.
115. Khoury JC, Kleindorfer D, Alwell K, Moomaw CJ, Woo D, Adeoye O, Flaherty ML, Khatri P, Ferioli S, Broderick JP. Diabetes mellitus: a risk factor for ischemic stroke in a large biracial population. *J Stroke*. 2013;44(6):1500-4.
116. Dikaïou P, Björck L, Adiels M, Lundberg CE, Mandalenakis Z, Manhem K, Rosengren A. Obesity, overweight and risk for cardiovascular disease and mortality in young women. *J European journal of preventive cardiology*. 2021;28(12):1351-9.
117. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, Kase CS, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Manson JE. Body mass index and the risk of stroke in men. *J Archives of internal medicine*. 2002;162(22):2557-62.

118. Strazzullo P, D'Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *J Stroke*. 2010;41(5):e418-e26.
119. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *J Stroke*. 1991;22(8):983-8.
120. Okumura K, Tomita H, Nakai M, Kodani E, Akao M, Suzuki S, Hayashi K, Sawano M, Goya M, Yamashita T. Risk factors associated with ischemic stroke in Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation. *J JAMA network open*. 2020;3(4):e202881-e.
121. Go AS, Reynolds K, Yang J, Gupta N, Lenane J, Sung SH, Harrison TN, Liu TI, Solomon MD. Association of burden of atrial fibrillation with risk of ischemic stroke in adults with paroxysmal atrial fibrillation: the KP-RHYTHM study. *J JAMA cardiology*. 2018;3(7):601-8.
122. Yuan K, Zhu S, Wang H, Chen J, Zhang X, Xu P, Xie Y, Zhu X, Zhu W, Sun W. Association between malnutrition and long-term mortality in older adults with ischemic stroke. *J Clinical Nutrition*. 2021;40(5):2535-42.
123. Bao Y, Zhang Y, Du C, Ji Y, Dai Y, Jiang W. Malnutrition and the Risk of Early Neurological Deterioration in Elderly Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Neuropsychiatric Disease Treatment*. 2022:1779-87.
124. Foroughi M, Akhavanzanjani M, Maghsoudi Z, Ghiasvand R, Khorvash F, Askari G. Stroke and nutrition: a review of studies. *J International journal of preventive medicine*. 2013;4(Suppl 2):S165.
125. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *J New England journal of medicine*. 2018;378(25):e34.
126. Chen G-C, Neelakantan N, Martín-Calvo N, Koh W-P, Yuan J-M, Bonaccio M, Iacoviello L, Martínez-González MA, Qin L-Q, van Dam RM. Adherence to the Mediterranean diet and risk of stroke and stroke subtypes. *J European Journal of Epidemiology*. 2019;34:337-49.
127. Ram CVS, Kumar S, Renjen PN, Kumar GP, Swaminathan J, Reddy CR, Kondati S, Sharma M, Selvan VA, Sundaram M. Risk factors predisposing to acute stroke in India: a prospective study. *J Journal of hypertension*. 2021;39(11):2183-9.

128. Kono Y, Kawajiri H, Kamisaka K, Kamiya K, Akao K, Asai C, Inuzuka K, Yamada S. Predictive impact of daily physical activity on new vascular events in patients with mild ischemic stroke. *J International Journal of Stroke*. 2015,10(2):219-23.
129. Manchev IC, Mineva PP, Hadjiev DI. Prevalence of stroke risk factors and their outcomes. *J Cerebrovascular diseases*. 2001,12(4):303-7.
130. Gill JS, Shipley MJ, Tsementzis SA, Hornby R, Gill SK, Hitchcock ER, Beevers DG. Cigarette smoking: a risk factor for hemorrhagic and nonhemorrhagic stroke. *J Archives of Internal Medicine*. 1989,149(9):2053-7.
131. Iso H, Baba S, Mannami T, Sasaki S, Okada K, Konishi M, Tsugane SJS. Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. *J Stroke*. 2004,35(5):1124-9.
132. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *J Cell calcium*. 2010,47(2):122-9.
133. Kaplan JH. Biochemistry of Na⁺, K-ATPase. *J Annual review of biochemistry*. 2002,71(1):511-35.
134. Dreier JP, Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *J Neuron*. 2015,86(4):902-22.
135. Hyman SE. Neurotransmitters. *J Current biology*. 2005,15(5):R154-R8.
136. Dobrek Ł, Thor P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *J Advances in Hygiene Experimental Medicine*. 2011,65:338-46.
137. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: A triad in synaptic neurodegeneration. *J Translational neurodegeneration*. 2022,11(1):3.
138. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *J Neurosurgical focus*. 2007,22(5):1-9.
139. Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *J Trends in neurosciences*. 2005,28(12):670-6.
140. Blagosklonny M. Cell death beyond apoptosis. *J Leukemia*. 2000,14(8):1502-8.
141. Hsieh MH, Nguyen HT. Molecular mechanism of apoptosis induced by mechanical forces. *J International review of cytology*. 2005,245:45-90.
142. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *J Oncogene*. 2008,27(48):6194-206.

143. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *J Biochemical biophysical research communications*. 2018,500(1):26-34.
144. Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu S-C, Xu M, Hsu Y-T. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation. *J Apoptosis*. 2003,8:617-29.
145. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *J Annual review of biochemistry*. 2004,73(1):87-106.
146. Tanida IJM. Autophagy basics. *J Microbiology immunology*. 2011,55(1):1-11.
147. Mizushima N. Autophagy: process and function. *J Genes development*. 2007,21(22):2861-73.
148. Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, Yokoyama Y, Hayashi Y, Hirayama D, Wagatsuma K, Itoi T, Nakase H. Autophagy and autophagy-related diseases: a review. *J International journal of molecular sciences*. 2020,21(23):8974.
149. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *J Nature cell biology*. 2010,12(9):814-22.
150. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *J Molecular cell*. 2014,53(2):167-78.
151. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *J Cell*. 2011,147(4):728-41.
152. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *J Cellular molecular biology letters*. 2016,21:1-14.
153. Gabryel B, Kost A, Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia—a potential target for neuroprotective strategies? *J Pharmacological Reports*. 2012,64(1):1-15.
154. De Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Renard P, Muñoz C, Millan MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *J Nature reviews Drug discovery*. 2010,9(8):628-42.
155. Vujjini SK, Datla VKR, Badarla KR, Vetukuri VPR, Bandichhor R, Kagga M, Cherukupally P. Total synthesis of agomelatine via Friedel–Crafts acylation followed by Willgerodt–Kindler reaction. *J Tetrahedron Letters*. 2014,55(29):3885-7.

156. Yang J, Jin HJ, Mocaër E, Seguin L, Zhao H, Rusak B. Agomelatine affects rat suprachiasmatic nucleus neurons via melatonin and serotonin receptors. *J Life sciences*. 2016,155:147-54.
157. Van Reeth O, Weibel L, Olivares E, Maccari S, Mocaer E, Turek FW. Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus. *J American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative Comparative Physiology*. 2001,280(5):R1582-R91.
158. Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Rivet J-M, Cussac D. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 2003,306(3):954-64.
159. Chenu F, El Mansari M, Blier P. Electrophysiological effects of repeated administration of agomelatine on the dopamine, norepinephrine, and serotonin systems in the rat brain. *J Neuropsychopharmacology*. 2013,38(2):275-84.
160. Pu Z, Hou Q, Yan H, Lin Y, Guo Z. Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation and agomelatine on sleep quality and biomarkers of adult patients with mild to moderate depressive disorder. *J Journal of Affective Disorders*. 2023,323:55-61.
161. Tchekalarova J, Kortenska L, Ivanova N, Atanasova M, Marinov P. Agomelatine treatment corrects impaired sleep-wake cycle and sleep architecture and increases MT 1 receptor as well as BDNF expression in the hippocampus during the subjective light phase of rats exposed to chronic constant light. *J Psychopharmacology*. 2020,237:503-18.
162. Gumuslu E, Mutlu O, Sunnetci D, Ulak G, Celikyurt IK, Cine N, Akar F, Savli H, Erden F. The antidepressant agomelatine improves memory deterioration and upregulates CREB and BDNF gene expression levels in unpredictable chronic mild stress (UCMS)-exposed mice. *J Drug target insights*. 2014,8:DTI. S13870.
163. Lu Y, Ho CS, McIntyre RS, Wang W, Ho RC. Agomelatine-induced modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus. *J Life sciences*. 2018,210:177-84.
164. Molteni R, Calabrese F, Pisoni S, Gabriel C, Mocaer E, Racagni G, Riva MA. Synergistic mechanisms in the modulation of the neurotrophin BDNF in the rat

- prefrontal cortex following acute agomelatine administration. *J The World Journal of Biological Psychiatry*. 2010,11(2):148-53.
165. Atanasova D, Lazarov N, Stoyanov DS, Spassov RH, Tonchev AB, Tchekalarova J. Reduced neuroinflammation and enhanced neurogenesis following chronic agomelatine treatment in rats undergoing chronic constant light. *J Neuropharmacology*. 2021,197:108706.
 166. Banasr M, Soumier A, Hery M, Mocaër E, Daszuta A. Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis. *J Biological psychiatry*. 2006,59(11):1087-96.
 167. Soumier A, Banasr M, Lortet S, Masméjean F, Bernard N, Kerkerian-Le-Goff L, Gabriel C, Millan MJ, Mocaer E, Daszuta A. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *J Neuropsychopharmacology*. 2009,34(11):2390-403.
 168. Abdelaziz M, Mohamed AF, Zaki HF, Gad SS. Agomelatine improves memory and learning impairments in a rat model of LPS-induced neurotoxicity by modulating the ERK/SorLA/BDNF/TrkB pathway. *J Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023:1-14.
 169. Savran M, Asci S, Gulle K, Aslankoc R, Asci H, Karakuyu NF, Erzurumlu Y, Kaynak M. Agomelatine ameliorates doxorubicin-induced cortical and hippocampal brain injury via inhibition of TNF-alpha/NF-kB pathway. *J Toxicology Mechanisms Methods*. 2023:1-10.
 170. Yang X-b, Zu H-b, Zhao Y-f, Yao K. Agomelatine prevents amyloid plaque deposition, tau phosphorylation, and Neuroinflammation in APP/PS1 mice. *J Frontiers in aging neuroscience*. 2022,13:766410.
 171. Cheng F, Chang H, Yan F, Yang A, Liu J, Liu Y. Agomelatine attenuates isoflurane-induced inflammation and damage in brain endothelial cells. *J Drug Design, Development Therapy*. 2020:5589-98.
 172. Ozcan M, Canpolat S, Bulmus O, Ulker N, Tektemur A, Tekin S, Ozcan S, Serhatlioglu I, Kacar E, Ayar A. Agomelatine pretreatment prevents development of hyperglycemia and hypoinsulinemia in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Fundamental clinical pharmacology*. 2019,33(2):170-80.

173. Diez-Echave P, Vezza T, Algieri F, Ruiz-Malagón AJ, Hidalgo-García L, García F, Morón R, Sánchez M, Toral M, Romero M. The melatonergic agonist agomelatine ameliorates high fat diet-induced obesity in mice through the modulation of the gut microbiome. *J Biomedicine Pharmacotherapy*. 2022;153:113445.
174. Veronesi VB, Pioli MR, de Souza DN, Teixeira CJ, Murata GM, Santos-Silva JC, Hecht FB, Vicente JM, Bordin S, Anhe GF. Agomelatine reduces circulating triacylglycerides and hepatic steatosis in fructose-treated rats. *J Biomedicine Pharmacotherapy*. 2021;141:111807.
175. Cherngwell R, Pengrattanachot N, Swe MT, Thongnak L, Promsan S, Phengpol N, Sutthasupha P, Lungkaphin A. Agomelatine protects against obesity-induced renal injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress/apoptosis pathway in rats. *Toxicology Applied Pharmacology*. 2021;425:115601.
176. Promsan S, Thongnak L, Pengrattanachot N, Phengpol N, Sutthasupha P, Lungkaphin A. Agomelatine, a structural analog of melatonin, improves kidney dysfunction through regulating the AMPK/mTOR signaling pathway to promote autophagy in obese rats. *J Food Chemical Toxicology*. 2022;165:113190.
177. Mahmoud NM, Elshazly SM, Hassan AA, Soliman E. Agomelatine improves streptozotocin-induced diabetic nephropathy through melatonin receptors/SIRT1 signaling pathway. *J International Immunopharmacology*. 2023;115:109646.
178. Naphade VD, Parihar G, Jain D, Bendale AR. Investigation of the effect of agomelatine on cellular and humoral immunity in mice. *J International Journal of Pharmacy Life Sciences*. 2020;11(6).
179. Hanoun N, Mocaër E, Boyer P-A, Hamon M, Lanfumey L. Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *J Neuropharmacology*. 2004;47(4):515-26.
180. Altintas R, Parlakpınar H, Beytur A, Vardi N, Polat A, Sagir M, Odabas GP. Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *J Kidney Blood Pressure Research*. 2013;36(1):220-30.
181. Zhang F, Chen J. Infarct measurement in focal cerebral ischemia: TTC staining 2012. 93-8 p.

182. Kondoh T, Uneyama H, Nishino H, Torii K. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. *J Life sciences*. 2002,72(4-5):583-90.
183. Desland FA, Afzal A, Warraich Z, Mocco J. Manual versus automated rodent behavioral assessment: comparing efficacy and ease of Bederson and Garcia neurological deficit scores to an open field video-tracking system. *J Journal of central nervous system disease*. 2014,6:JCNSD. S13194.
184. Brooks SP, Trueman RC, Dunnett SB. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. *J Current protocols in mouse biology*. 2012,2(1):37-53.
185. Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Freret T. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *J Nature protocols*. 2009,4(10):1560-4.
186. Li X-J, Liang L, Shi H-X, Sun X-P, Wang J, Zhang L-S. Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *J Neuropsychiatric disease treatment*. 2017:1733-40.
187. Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, Chang GLJJopr. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Journal of pineal research*. 2005,38(1):42-52.
188. Yilmaz U, Tanbek K, Gul S, Gul M, Koc A, Sandal S. Melatonin Attenuates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Through Inducing Autophagy. *J Neuroendocrinology*. 2023.
189. Gupta S, Sharma B, Behavior. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. *J Pharmacology Biochemistry*. 2014,122:122-35.
190. Loiseau F, Le Bihan C, Hamon M, Thiébot M-H. Effects of melatonin and agomelatine in anxiety-related procedures in rats: interaction with diazepam. *J European Neuropsychopharmacology*. 2006,16(6):417-28.
191. Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *J Biomedical reports*. 2013,1(6):861-7.
192. Akpınar A, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Agomelatine and duloxetine synergistically modulates apoptotic pathway by inhibiting oxidative stress triggered intracellular

- calcium entry in neuronal PC12 cells: role of TRPM2 and voltage-gated calcium channels. *J The Journal of membrane biology*. 2014,247:451-9.
193. Chanmanee T, Wongpun J, Tocharus C, Govitrapong P, Tocharus J. The effects of agomelatine on endoplasmic reticulum stress related to mitochondrial dysfunction in hippocampus of aging rat model. *J Chemico-Biological Interactions*. 2022,351:109703.
 194. Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazici-Mutlu Ç, Sonugur G, Ocal M, Akbulut H. The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *J Brain Research Bulletin*. 2018,137:306-10.
 195. Baydas G, Reiter R, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro-and anti-apoptotic protein levels. *J Neuroscience*. 2005,135(3):879-86.
 196. Hou K, Xu D, Li F, Chen S, Li Y. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: mechanisms, roles and research methods. *J Journal of the Neurological Sciences*. 2019,400:72-82.
 197. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J-i, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *J Nature*. 2006,441(7095):880-4.
 198. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *J Nature*. 2006,441(7095):885-9.
 199. Tang P, Hou H, Zhang L, Lan X, Mao Z, Liu D, He C, Du H, Zhang L. Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats. *J Molecular neurobiology*. 2014,49:276-87.
 200. Guo H, Zhao L, Wang B, Li X, Bai H, Liu H, Yue L, Guo W, Bian Z, Gao L. Remote limb ischemic postconditioning protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating AMPK-dependent autophagy. *J Brain Research Bulletin*. 2018,139:105-13.
 201. Wu M, Zhang H, Kai J, Zhu F, Dong J, Xu Z, Wong M, Zeng LH. Rapamycin prevents cerebral stroke by modulating apoptosis and autophagy in penumbra in rats. *J Annals of clinical translational neurology*. 2018,5(2):138-46.

202. Chen F, Chen S, Liu J, Amin N, Jin W, Fang M. Agomelatine softens depressive-like behavior through the regulation of autophagy and apoptosis. *J BioMed Research International*. 2021,2021.
203. Zhou N, Wei ZX, Qi ZX. Inhibition of autophagy triggers melatonin-induced apoptosis in glioblastoma cells. *J BMC neuroscience*. 2019,20:1-12.
204. Gao Q, Guo X, Cao Y, Jia X, Xu S, Lu C, Zhu H. Melatonin protects HT22 hippocampal cells from H2O2-induced injury by increasing Beclin1 and Atg protein levels to activate autophagy. *J Current pharmaceutical design*. 2021,27(3):446-54.

