



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL GLOBAL SEREBRAL İSKEMİ VE
REPERFÜZYON MODELİNDE CİNNAMON BARK OİL'İN BEYİN
DOKULARINDA ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Melike ABA

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yüksel KABLAN**

MALATYA-2021



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL GLOBAL SEREBRAL İSKEMİ VE
REPERFÜZYON MODELİNDE CİNNAMON BARK OİL'İN BEYİN
DOKULARINDA ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Melike ABA
ORCID ID:0000-0002-5910-5910**

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yüksel KABLAN**

**Bu tez çalışması İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2020-2147 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemik İnme.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Risk Faktörleri	4
2.1.4. Etyolojik Sınıflama.....	8
2.1.5. Klinik Sınıflama	9
2.1.6. Serebral Kan Dolaşımın Özet Anatomisi	10
2.1.7. Serebral İskemide Fizyopatoloji.....	13
2.1.8. Serebral İskemide Patofizyoloji	15
2.1.8.1. Serebral Hipoperfüzyon/Biyoenjerji Yetmezliği	15
2.1.8.2. Glutamat Eksitotoksitesi/Kalsiyum Sitotoksitesi	16
2.1.8.3. Mitokondriyal Hasarın Patogenezdaki Rolü	17
2.1.8.4. Oksidatif Stres.....	19
2.1.8.5. İskemi Sonrası Nöroinflamasyon.....	26
2.1.8.6. Kan Beyin Bariyerinin (KBB) Bozulması	29
2.1.8.7. Otofaji	30
2.1.8.7. İskemi Sonrası Nöronal Apoptoz.....	31
2.1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarı	33
2.1.10. Akut İskemik İnmede Güncel Tedaviler	39
2.2. Cinnamon Bark Oil	40
2.2.1. Genel Bilgiler	40
2.2.2. Cinnamon bark oil'in (CBO) kimyasal yapısı ve özellikleri	42
2.2.3. Tarçının Geleneksel Kullanımı	46
2.2.4. Klinik Farmakolojik Özellikleri	46

2.2.4.1. Anti-mikrobiyal etkisi	47
2.2.4.2. Anti-oksidan Etkisi	47
2.2.4.3. Anti-inflamatuar Etkisi	48
2.2.4.4. İnsülin Direnci, Diabetes Mellitus Tip 2 ve Metabolik Sendrom üzerine etkileri	48
2.2.4.5. Kanserle ilişkili etkiler	48
2.2.4.6. Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi	49
2.2.4.7. Anti-anksiyete ve Anti-depresan etkileri	49
2.2.5. Cinnamon Bark Oil'in Nörolojik Hastalılardaki Etkileri.....	49
2.2.5.1. İskemik beyin dokusunda anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri	49
2.2.5.2. Nörodejeneratif hastalıklarda etkileri	50
2.3. Çalışmada Kullanılan Enzim ve Moleküller	51
3. MATERYAL VE METOD.....	55
3.1. Çalışmanın Düzeni	55
3.2. Deney Hayvanları ve Barındırma.....	55
3.3. Global İskemi/Reperfüzyon (I/R) Modelinin Oluşturulması	55
3.4. Cinnamon Bark Oil'in (CBO) Hazırlanması.....	58
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	59
3.6. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması.....	60
3.6.1. Sakrifikasyon İşlemi, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	60
3.6.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması	61
3.6.3. Biyokimyasal Analizler	61
3.6.4. Histopatolojik Analizler	65
3.7. İstatistiksel Analizler.....	67
4. BULGULAR.....	68
4.1. Rat Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması	68
4.2. Histopatolojik Bulgular	68
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	83
4.3.1. Cinnamon Bark Oil'in Antioksidan Etkileri	84
4.3.2. Cinnamon Bark Oil'in Anti-inflamatuar Etkileri	88
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR	101

EKLER.....	Error! Bookmark not defined.
EK-1. Etik Kurul Onayı	Error! Bookmark not defined.
EK-2. Avrupa Farmakopesi Monografi	Error! Bookmark not defined.



TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle ile bana yol gösteren, bilimselliği her zaman ön planda tutan ve bu tezin hazırlanma sürecinde büyük desteği ve emeği olan kıymetli hocam, tez danışmanım ve Nöroloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yüksel KABLAN'a,

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen bölümümüz değerli öğretim üyeleri, Prof. Dr. Abdulcemal ÖZCAN, Prof. Dr. Özden KAMIŞLI, Prof. Dr. Suat KAMIŞLI, Doç. Dr. Mehmet TECELLİOĞLU'na,

Farmakolojik çalışmaların gerçekleştirilmesinde gösterdiği katkılardan dolayı Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a, histolojik incelemelerin tamamlanmasındaki katkılarında dolayı Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Nigar VARDI, Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE'ye, biyokimyasal incelemelerin değerlendirilmesindeki katkılarında dolayı Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e, Dr. Ahmet ULU'ya,

Tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında ve ratlara uygulanan cerrahi girişimlerde titizlikle çalışıp büyük yardımları olan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN'a ve eczacılık fakültesi lisans öğrencisi Mehmet Çolak'a,

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hemşire, personel ve her konuda destek olan sekreterlerimize,

Öğrenim hayatımda fedakarlıklarda bulunan ve hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme,

TTU-2020-2147 kodlu projeme destek olan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Melike ABA

ÖZET

Ratlarda Deneysel Global İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Cinnamon Bark Oil'in Beyin Dokularında Antioksidan ve Oksidan Etkilerinin Araştırılması

Amaç: *Cinnamomum verum* tarçının kabuğunda bulan ve bir esansiyel yağ olan Cinnamon Bark Oil'in (CBO) geniş bir aralığa yayılan farmakolojik etkiler gösterdiği bilinmektedir. CBO'nun serebral iskemi reperfüzyon (I/R) hasarında antioksidan, anti-inflamatuar, nöronal apoptozun düzenlenmesi ve nöroprotektif etkileri üzerine yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada CBO'nun bu etkilerini I/R hasarı oluşturulmuş rat modelinde araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 44 adet *Wistar albino* cinsi dişi rat 4 gruba ayrıldı; sham grubuna (n:8) CBO sham operasyon sonrası 1, 24, 48 ve 72.saatte, sadece I/R oluşturulan grup (n:12), profilaksi grubuna (n:12) CBO cerrahi öncesi 72, 48, 24 ve cerrahiden 1 saat önce en son doz, tedavi grubuna (n:12) CBO cerrahi girişimden 1, 24, 48, 72 saat sonra verildi. I/R modeli oluşturmak için iki yanlı karotis kommunis arterler 15 dakika klemplenerek iskemi oluşturuldu ve sonra açılarak reperfüzyon sağlandı. Ratlarda 72 saat reperfüzyon sağlandıktan sonra sakrifikasyon işlemi uygulandı. CBO, 100 mg/kg dozunda, oral yolla ve günde bir defa verildi.

Ratların beyin dokusunda histopatolojik incelemelerle birlikte süperoksit dismutaz (SOD), total glutatyon, total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK), malondialdehit (MDA), myeloperoksidaz, İnterlökin-1 ve TNF- α düzeyleri bakıldı.

Bulgular: Hem profilaksi hemde tedavi edilen grupta immünohistokimyasal boyamada (kaspaz-3, Bax) kortikal ve hipokampal nöronlarda dejenere nöron sayısında anlamlı azalma olduğu görüldü. Ayrıca ratların beyin dokusundaki I/R oksidatif ve inflammatuar hasarda, profilaksi grubunda SOD aktivitesi, hem profilaksi hem tedavi grubunda TAC düzeyi artmış buna karşılık MDA ve TNF düzeyleri her iki grupta anlamlı azalmıştı.

Sonuçlar: Bu bulgular CBO'nun olası antioksidan, anti-inflamatuar ve antiapoptotik etkileriyle hem profilakside hemde tedavide I/R hasarından koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Serebral iskemi, reperfüzyon hasarı, cinnamon bark oil, rat modeli

ABSTRACT

Evaluate of Antioxidant and Oxidant Effects of Cinnamon Bark Oil in Rat Model of Cerebral Global Ischemia Reperfusion Injury.

Aim: Cinnamon bark oil (CBO), an essential oil of *cinnamomum verum*'s barks, is known to exhibit a wide range of pharmacological activities. Few studies have focused on its antioxidant activity, anti-inflammatory activity, regulating neuron apoptosis, and neuroprotective effect during cerebral ischemia reperfusion (I/R) injury. We aimed to investigate these effects of CBO in rat model of I/R induced brain injury.

Material and Method: Forty four *Wistar- albino* race female rats were divided into four groups; sham rats (n:8) which were administered CBO in 1, 24, 48, and 72 hours after sham operation, rats (n:12) which underwent ischemic surgery, rats (n:12) which were treated with CBO in 72, 48, 24 and 1 hours before ischemic surgery (prophylaxis group), and rats (n:12) which were treated with CBO 1, 24, 48, and 72 hours after ischemic surgery (treatment group).

We performed the ischemic surgery by occluding the bilateral common carotid arteries for 15 min and sacrificed the rats 72 hours after the surgery. CBO was administered orally at 100 mg/kg body weight once daily. Brain tissues were isolated for histopathologic examination. Brain tissues were also used for determination of superoxide dismutase (SOD), total glutathione, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase, Interleukin-1, and TNF- α levels.

Results: We demonstrated significantly decreasing the number dead cortical and hippocampal neuronal cell with immunohistochemical staining method (caspase-3, Bax) both prophylaxis and treatments groups. Additionally, I/R oxidative and inflammatory injury in rat was demonstrated by a significant increase in SOD activities in prophylaxis group, TAC levels in both prophylaxis and treatment groups, and significant decrease in MDA and TNF- α levels in both prophylaxis and treatment groups.

Conclusion: The results show that CBO is able to protect the brain against I/R injury probably due to its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties in both prophylaxis and treatment groups.

Key Word: Cerebral ischemia, reperfusion injury, cinnamon bark oil, rat model

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
AIF	: Apoptozu İndükleyen Faktör
Apaf1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1
AHA	: Amerikan Kalp Derneği
ASA	: Amerikan İnme Derneği
AF	: Atrial Fibrilasyon
AH	: Alzheimer Hastalığı
ACA	: Anterior Serebral Arter
ACoA	: Anterior Komünikan Arter
AMPA	: Amino-3-Hidroksi-5-Metiloksazol-4-Propiyonik Asit
Bcl-2	: B-Hücreli Lenfoma/Lösemi-2 Geni
Bax	: Bcl-2-İlişkili X Protein
CBO	: Cinnamon Bark Oil
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CCA	: Carotis Communis Arter
CCL2	: Monosit Kemo-Atraktan Protein
DAMPs	: Hasarla İlişkili Moleküler Modeller
DALY	: Engelliliğe Ayarlanmış Yaşam Yılı
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECA	: Eksternal Carotid Arter
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FasL	: İlk Apoptoz Sinyal Ligandı
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HT	: Hipertansiyon

HE	: Hematoksilen-Eozin
ICA	: İnternal Carotid Arter
IL	: İnterlökin
I/R	: İskemi- Reperfüzyon
ICAM-1	: İntrasellüler Hücre Adhezyon Molekülü
IHC	: İmmünohistokimyasal
iNOS	: İndüklenen Nitrik Oksit Sentaz
İV	: İntravenöz
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LACI	: Laküner İnfarktlar
LC3-I	: Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3
LC3-II	: Mikrotübül İlişkili Protein 2 Hafif Zincir 3
MAC	: Membran Atak Kompleksi
MCA	: Orta Serebral Arter
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MPTP	: 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NF- κB	: Nükleer Faktör-κB
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PACI	: Parsiyel Anterior Sirkülasyon İnfarktları
PAR1	: Proteaz ile Aktive Olan Reseptör

PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PECAM-1	: Platelet Endotelyal Hücre Adhezyon Molekülü
POCI	: Posterior Sirkülasyon İnfarktları
PCA	: Posterior Serebral Arter
PCoA	: Posterior Komünikan Arter
PI3 K/Akt	: Fosfoinosit 3-Kinaz/Akt
PH	: Parkinson Hastalığı
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
RNS	: Serbest Nitrat Radikalleri
RNA	: Ribonükleik Asit
rt-PA	: Rekombinant Doku Plazminojen Aktivatörü
SOD	: Süperoksid Dismutaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TOK	: Total Oksidan Kapasite
TACI	: Total Anterior Sirkülasyon İnfarktları
TLR	: Toll-Like Reseptör
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü α
tGSH	: Total Glutasyon
VCAM	: Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Arkus aorta ve dalları	11
Şekil 2.2. Willis poligonunun kafa tabanından görünümü.....	13
Şekil 2.3. İskemi sonrası beyin hasar alanları	14
Şekil 2.4. Nöron içinde mitokondrideki füzyon ve fregmantasyon süreci	19
Şekil 2.5. Mitofajinin nöropatogenezdeki rolü	19
Şekil 2.6. Serbest oksijen radikalleri	24
Şekil 2.7. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve enzimlerle detoksifikasyon süreci	25
Şekil 2.8. İskemi sonrası nöropatogenezde rol alan mekanizmalar.....	26
Şekil 2.9. İskemi sonrası santral sinir sistemi ve periferik immün sistem arasındaki etkileşim.....	28
Şekil 2.10. Kan beyin bariyerinin yapısı	30
Şekil 2.11. İskemi sonrası apoptoz mekanizmaları	33
Şekil 2.12. İskemi reperfüzyon hasarında patofizyolojik mekanizmalar	38
Şekil 2.13. İskemi sonrası erken ve geç hemorajik transformasyonda kan beyin bariyerinin rolü.....	39
Şekil 2.14. Cinnamomum verum tarçının kabuk, yaprak ve meyvesi	42
Şekil 2.15. Cinnamon Bark Oil'in kimyasal yapısında bulunan bazı bileşikler.....	46
Şekil 3.1. Deney sırasında uygulanan cerrahi prosedürde bilateral karotis kommunis arterlerin oklüzyon aşamaları.....	57
Şekil 3.2. Deney sonrası postoperatif bakım ünitesi ve ratların beslenmesi	58
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan cinnamon bark oil	59
Şekil 3.4. Ratlardan intrakardiyak yol ile kan örnekleri alınması	60
Şekil 3.5. Çıkarılan rat beyninin mezial ve süperiordan görünümü	61
Şekil 4.1. Sham grubu: Serebral korteksin normal histolojik görünümü ve lamina molekulare tabakası (yıldız) H-E; X100.	69
Şekil 4.2. Sham grubu: nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X400.	69
Şekil 4.3. Sham grubu: Hipokampusün normal histolojik görünümü. Dentate gyrus (DG) ve Cornu ammonis (CA-1,2,3 ve CA-4 alanları) H-E; X40.....	70

Şekil 4.4. Sham grubu: Hipokampüsün normal histolojik görünümü H-E; X400.	70
Şekil 4.5. Kontrol grubu: Korteks alanı kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesit; X400.....	71
Şekil 4.6. Sham grubu: Hipokampüs alanı kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesit; X400.....	71
Şekil 4.7. Sham grubu: Korteks alanı; Bax boyama metodu uygulanan kesit, X400.....	72
Şekil 4.8. Sham grubu: Hipokampüs alanı, Bax boyama metodu uygulanan kesit; X400.....	72
Şekil 4.9. I/R grubu. Sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.....	73
Şekil 4.10. I/R grubu. Hipokampüsde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.	74
Şekil 4.11. I/R grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.....	74
Şekil 4.12. I/R grubu. Hipokampüsde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.....	75
Şekil 4.13. I/R grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.....	75
Şekil 4.14. I/R grubu. Hipokampüsde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400... ..	76
Şekil 4.15. I/R+CBO grubu. Sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.	77
Şekil 4.16. I/R+CBO grubu. Hipokampüsde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.	77
Şekil 4.17. I/R+CBO grubu. Korteksde kaspaz-3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.....	78
Şekil 4.18. I/R+CBO grubu. Hipokampüsde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.....	78
Şekil 4.19. I/R+CBO grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.....	79
Şekil 4.20. I/R+CBO grubu. Hipokampüsde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.	79

Şekil 4.21. CBO+I/R grubu. Sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.	80
Şekil 4.22. CBO+I/R grubu. Hipokampüsde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.	81
Şekil 4.23. CBO+I/R grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.	81
Şekil 4.24. CBO+I/R grubu. Hipokampüsde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.	82
Şekil 4.25. CBO+I/R grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.	82
Şekil 4.26. CBO+I/R grubu. Hipokampüsde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.	83
Şekil 4.27. Grupların Antioksidan Parametrelerinin Grafikselsel Olarak Karşılaştırılması (MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz, tGSH: Total glutatyon, TOK: Total oksidan kapasite, TAK: Total antioksidan kapasite, OSI: Oksidatif stres indeksi).	87
Şekil 4.28. Grupların İnflamatuvar Parametrelerinin Grafikselsel Olarak Karşılaştırılması (MPO: Miyeloperoksidaz, TNF-a: Tümör nekroz faktörü-a, IL-1: İnterlökin-1)	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. İskemik İnmede Risk Faktörleri	7
Tablo 2.2. Tarçının (<i>C.verum</i>) Kimyasal Bileşenleri	44
Tablo 3.1. Deney Gruplarının Sınıflandırılması	60
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
Tablo 3.3. Doku Takibi Prosedürü (Tissue-Tek VIP/SAKURA)	66
Tablo 3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü (Leica Aotostiner XL cihazı).....	66
Tablo 3.5. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	67
Tablo 4.1. Ratların Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	68
Tablo 4.2. Ratların Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması	68
Tablo 4.3. Histopatolojik Bulguların Karşılaştırılması	83
Tablo 4.4. Grupların Serum Biyokimyasal Bulguların Karşılaştırılması.....	84
Tablo 4.5. Beyin Dokusu İnflamatuar Parametrelerinin Düzeylerinin Karşılaştırılması	87
Tablo 4.6. Grupların Antioksidan Parametreler Bakımından Karşılaştırılması.....	88
Tablo 4.7. Beyin Dokusu İnflamatuar Parametrelerinin Düzeylerinin Karşılaştırılması	89
Tablo 4.8. Grupların İnflamatuar Parametreler Bakımından Karşılaştırılması.....	89

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnme, dünya genelinde ölüme yol açan hastalıklar içinde 2.sırada yer almaktadır. Her yıl yaklaşık 14 milyon kişi inme geçirmekte ve yaklaşık 5.5 milyon kişi bu nedenle ölmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, inme yükünün tüm dünyada ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde giderek arttığını göstermektedir. Dahası bu çalışmalardan gelen veriler ileri yaş hastalığı ve insidansı yaşla birlikte artan bir hastalık olarak bilinen inmenin artık 20-54 yaş arası daha genç popülasyonda da insidansında bir artış olduğunu göstermektedir (1).

Bireysel, toplumsal sonuçları ağır ve yaygın bir hastalık olmasına rağmen güncel olarak iskemik inmenin akut döneminde reperfüzyonu hedefleyen, kısa bir zaman aralığıyla sınırlı, sadece belli kriterleri karşılayan hastalara uygulanabilen İV trombolitik tedavi ve mekanik trombektomi dışında bir tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır (2, 3).

Akut inmede altın standart kabul edilen bu tedavilerle sağlanan rekanalizasyon her zaman iskemik dokuda reperfüzyonu sağlamadığı ya da yetersiz sağladığı gibi belli bir süre iskemide kalmış beyin dokusunda ani ve hızla artan oksijen düzeyleri oksijen paradoksu adı verilen bir dizi reaksiyonla dokuya fonksiyonel, mikroskopik ve bazen makroskopik hasar vermektedir. Bu hasar, iskemiye bağlı oluşan hasara eklenir ve iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı olarak adlandırılır (4). Bu durum akut inmede iskemik dokuda spontan olarak gelişen ya da bu rekanalizasyon tedavileriyle ortaya çıkan I/R'nun hasarını engellemeye/azaltmaya yönelik klinik araştırmalar ve deneysel hayvan modellerinde diğer potansiyel tedavilerin geliştirilmesini gündeme getirmektedir.

Nöroprotektif tedavi; iskemi sonucu ortaya çıkan hücresel, biyokimyasal ve metabolik hasarı engellemeye yönelik bir tedavidir. Reperfüzyon tedavilerinde olduğu gibi nöroprotektif tedavilerde de amaç iskemik çekirdeğin genişlemesini önleyerek iskemik penumbranın kurtarılmasıdır.

Literatürde iskemik inme ile ilgili nöropatogenez sürecinde rol oynayan moleküler ve hücresel düzeydeki mekanizmaların her bir basamağını hedef alan gen terapisi dahil çok fazla sayıda ilaç, molekül ve nutrasötiklerle yapılmış preklinik çalışmalarda bu tedavilerin protektif etkili olabilecekleri gösterilmiş olsa da bu tedaviler henüz klinik uygulamalara başarılı bir şekilde aktarılabilmemiş değildir (5).

Tarçın, insanlık tarihinin bilinen en eski baharatlarından biridir. Eski Mısır'da ve Roma İmparatorluğunda ölümlerin mumyalanmasında, Avrupa'da dinsel ayinlerde, bir

baharat olarak gıdaların tad ve aromasının artırılmasında, gıdaların korunmasında, ağacın meyvesinden elde edilen tarçın esansı parfüm endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra tarih boyunca tıbbın pek çok alanında tedavi amaçlı kullanım alanı olmuştur (6, 7). Tarçın bitkisinin dünyada farklı coğrafyalara dağılmış 250’den fazla türü bulunmasına rağmen Seylan tarçını (*Cinnamomum verum* J. Presl sinonimi *Cinnamomum zeylanicum* veya hakiki tarçın) ve Çin tarçını (*Cinnamomum cassia*) bilinen en önemli iki türüdür (8).

Tarçın (*Cinnamomum verum*) içerik olarak kabuk, yaprak, çiçek ve meyve kısmında çok sayıda reçine özelliğindeki bileşiklerden ve esansiyel yağlardan oluşmaktadır. Tarçın kabuğundan elde edilen bir esansiyel yağ olan Cinnamon Bark Oil (CBO) kimyasal olarak aldehit, monoterpen, diterpen, seskuiterpen, hidrokarbon, flavonoid ve polifenol sınıfından birçok bileşik içermektedir. CBO’nun içeriğinde bulunan başlıca biyoaktif bileşik aldehit sınıfından bir bileşik olan sinnamaldehit’tir (9).

İskemi veya I/R hasarı oluşturulmuş farklı deneysel modellerle yapılan çalışmalarda CBO’nun majör bileşiği olan sinnemaldehit ve tarçının içeriğindeki diğer bileşiklerin, iskemi nöropatogenezinde rol oynayan glutamat eksitotokisitesini azaltıcı, oksidatif strese karşı antioksidan, anti-inflamatuar özellikleri olduğu, iskemik dokuda nöroprotektif etki gösterdiği ve apoptozdan koruyucu olduğu gösterilmiştir (10-15).

Cinnamon bark oil’in literatürde bulunan oldukça az sayıda çalışmada ortaya konmuş etkilerinden yola çıkılarak bu çalışmada, iki yanlı karotis kommunis arterlerin oklüzyonu ile oluşturulan deneysel global I/R modelinde CBO’nun beyin dokularında olası antioksidan ve oksidan etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemik İnme

2.1.1. Tanım

İnme; klinik olarak ani başlayan, focal nörolojik defisite yol açan, 24 saat veya daha uzun sürebildiği gibi ölümle de sonlanabilen, serebral, spinal kord ve retinada focal infarkt veya hemoraji (BT/MR veya otopside saptanan) sonucu gelişen bir sendromdur (16).

İnme, sistemik hipoperfüzyon, tromboz veya emboliye bağlı gelişen iskemik, intraserebral veya subaraknoid kanamaya bağlı gelişen hemorajik olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

2.1.2. Epidemiyoloji

İnmeye bağlı ölümler, dünyada görülen tüm ölümler dikkate alındığında yaklaşık %11.8 oranında görülmektedir. Bu haliyle koroner arter hastalıklarından sonra ölüm sebepleri arasında 2. sırada yer alır. Ayrıca mutlak bir sağlık kaybı ölçütü olan ve sağlıklı yaşamdan yitirilen yıllara karşılık gelen engelliliğe ayarlanmış yaşam yılı (DALY) kayıplarının gelişmekte olan ülkelerde ikinci, gelişmiş ülkelere ise üçüncü sıradadır (17).

İnme, ülkemizde de ölüm nedenleri arasında 2. sırada ve DALY kayıplarında tüm hastalıklar göz önüne alındığında 3.sırada yer almaktadır (18). Dünya genelinde tüm inmelerin %87'sini iskemik inme, %10'unu intraserebral ve %3'nü subaraknoid kanamalar oluşturmaktadır (19). Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre her yıl yaklaşık 15 milyon kişi inme geçirmektedir. Bunların 5 milyonu ölmekte ve 5 milyonu toplum ve aileye yük getirecek şekilde sakat kalmaktadır (20). Ayrıca yaşamları boyunca yaklaşık her 6 kişiden 1'nin inme geçireceği ön görülmektedir (21). DALY kayıpları 1990 yılında yaklaşık 38 milyon iken 2020 yılında bu kayıp 61 milyona yükselmiş durumdadır (20).

Gelişmekte olan ülkelere görülen sağlık politikalarındaki değişim, inmenin önlenmesi ve tedavisinde gelişmiş ülkelere göre bu ülkelerin daha geriden geliyor olmaları ayrıca dünyada yaşlı sayısının giderek artıyor olması nedeniyle inmenin giderek

artış göstereceği ve 2030'da 70 milyon inme hastası, 12 milyon inmeye bağlı ölüm ve 200 milyonun üzerinde DALY kaybı olabileceği tahmin edilmektedir (18).

2.1.3. Risk Faktörleri

İnme risk faktörleri değiştirilemeyen ve değiştirilebilir olarak sınıflanmaktadır (tablo 2.1).

I-Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

a) Yaş: İnme insidansı yaşla birlikte artar ve 55 yaşından sonra her on yılda iki katına çıkmaktadır (22). Bununla birlikte son dekadlarda 20-54 yaş aralığında inme prevalansı, yeni inmeli olgu, ölüm ve DALY kaybı mutlak sayılarında anlamlı artış olduğu bildirilmektedir (1, 23).

b) Cinsiyet: İnme erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmektedir (18). Fakat genç kadınlarda gebelik, oral kontraseptif kullanımı, auralı migren, postpartum dönemle ilişkili olarak 35-44 yaş arasında ve ortalama ömrün kadınlarda daha uzun olması nedeniyle ≥ 85 yaşındaki kadınlarda inme insidansı erkeklere göre daha yüksek oranlarda görülmektedir (1, 24).

c) Irk/Etnisite: İnme insidansının beyaz ırka oranla siyah ırkta daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Siyah ırkta, inme insidansı yaklaşık 2 kat daha fazladır (25).

d) Genetik: Ailede inme öyküsünün varlığı inme riskini %30 oranında artırmaktadır. Uluslararası ve çok merkezli yürütülen genom çalışmalarında iskemik inmeyle ilişkili bazı lokuslar olduğu bulunmuştur (18).

II-Değiştirilebilir Risk Faktörleri

İnmede risk faktörlerini araştıran uluslararası ve çok merkezli çalışmalarda tüm inmelerin yaklaşık %90'ının potansiyel olarak değiştirilebilir 10 risk faktörüyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Cinsiyet, etnik yapı ayırt etmeksizin ve tüm yaş gruplarında; hipertansiyon, diyabetes mellitus, kardiyak nedenler, sigara, alkol tüketimi, diyet, fiziksel inaktivite, apolipoprotein B/A1 oranı, abdominal obesite (bel/kalça oranı) ve psikososyal faktörlerin iskemik inme için potansiyel değiştirilebilir risk faktörü oldukları bulunmuştur (26, 27).

Bu çok merkezli çalışmalarla benzer tarihte 188 ülkeden gelen veriler kullanılarak yapılan bir meta-analiz çalışmasında bu 10 risk faktörleriyle büyük oranda kesişme gösteren fakat bir kısmı tamamen yeni toplam 17 risk faktörü tanımlanmıştır (23, 28).

Bu faktörler şunlardır;

- Fizyolojik faktörler (sistolik kan basıncı yüksekliği, açlık kan şekeri yüksekliği, vücut kitle indeksinin yüksek olması, total kolesterol düzeyinin yüksek olması, glomerüler filtrasyon hızı)
- Sigara için aktif ve pasif içici olmak
- Fiziksel inaktivite
- Diyet içeriğine ait riskler (yüksek sodyum, şekerli içecekler, sebze, meyve ve tam tahılı az tüketmek, alkol kullanmak)
- Çevresel riskler ve hava kirliliği (çapı 2.5 mikrondan küçük partiküller (PM2.5), evlerde katı yakıt kullanılması, kurşuna maruz kalmak)

1) Hipertansiyon: İnmenin her iki alt tipi için değiştirilebilir en önemli risk faktörüdür. İnme riski, kan basıncı >160/90 mm Hg olması durumunda yaklaşık 3 kat artış göstermektedir (29). Hipertansif olarak tanımlanmayan hastalarda bile kan basıncı ne kadar yüksek ise inme riski de o kadar artmaktadır (24). Kan basıncında 5-10 mm Hg'lık bir düşme inme riskini ortalama % 42 oranında azaltmaktadır (1). Diabetes mellitusla birlikte HT tanısı olan hastalarda kan basıncının <120/80 mm Hg olması yaşam boyu inme riskini %50 oranında azaltmaktadır (30). Bu hastalarda sistolik kan basıncında her 5 mm Hg'lık düşüş inme riskinde %13, her diastolik kan basıncında 2 mm Hg'lık düşüş inme riskini %11.5 oranında azaltmaktadır (31).

2) Diyabetes Mellitus (DM): Prediyabet, DM tip 1 ve tip 2'nin her biri inme için başlıca risk faktörüdür (23). Diabet varlığı iskemik inme için bağımsız bir risk faktörüdür ve inme riskini 1.4-6 kat arttırmaktadır (32). DM, tekrarlayan inme için de bağımsız bir risk faktörüdür (33). İnme geçiren diabetik hastalarda mortalite %20 daha fazla görülmektedir. Bu hastalarda diabetik olmayan hastalara göre prognoz (iyileşme, sakatlık oranı gibi) daha kötü seyretmektedir (1). Bu nedenle inme geçiren hastalar glikolizlenmiş hemoglobin (HbA1c) düzeyi, açlık kan şekeri ve oral glikoz tolerans testi ile diyabet/prediyabet yönünden değerlendirilmelidir (24).

3) Kalp Hastalıkları: Atrial fibrilasyon (AF) inme için önemli önlenabilir bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (24). Tüm yaş gruplarında AF inme riskini yaklaşık

5 kat artırmaktadır. AF prevalansı 50-59 yaş arasında %1.5 iken, 80-89 yaş arasında %23.5'lere çıkmaktadır (19). İnme riski açısından paroksizmal AF ile kronik AF aralarında fark yoktur (34). Paroksizmal AF kriptojenik inme veya geçici iskemik atak nedeniyle takipte olan hastaların %12-23'ünde görülmektedir (35). Diğer kardiyak nedenler arasında akut myokard infarktüsü, paroksizmal supraventriküler taşikardiler, konjenital defektler (PFO, ASD gibi), sol atrial tümör, primer kardiyak tümörler, prostetik kalp kapakları, dilate kardiyomiyopati, koroner arter hastalığı, romatizmal kapak hastalıkları ve endokardit bulunmaktadır (36).

4) Sigara Kullanım: Sigara kullanımı iskemik inme riskini yaklaşık 2-4 kat arttıran bağımsız bir risk faktörüdür (37). Pasif sigara içiciliği de maruz kalınan dozla orantılı olarak inme riskini %30 oranında arttırmaktadır (38-40). Sigara, inmeyele ilişkili ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır (1). Sigaranın bırakılması inme riskini tüm yaş gruplarında, ırklarda ve her iki cinsten azalttığı bildirilmektedir (19).

5) Alkol Tüketimi: İskemik inme riski ile alkol kullanımı arasında J şeklinde bir ilişki bulunmaktadır. İnme riski günlük tüketilen alkol miktarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Alkolün hafif ve orta düzeyde tüketilmesi (kadınlar için ≤ 1 kadeh (12 g alkol), erkekler için ≤ 2 kadeh) iskemik inmeden koruyucu etki gösterirken, daha yüksek miktarlar tersine inme riskini arttırmaktadır (1).

6) Diyet ve Beslenme: Beslenme içeriğinin kötü olması iskemik inme ve inmeye bağlı ölüm riskini bağımsız olarak arttıran bir risk faktörüdür. Ayrıca obezite, hipertansiyon, DM, AF ve hiperlipidemi gibi diğer vasküler risk faktörlerini de etkilemektedir (1, 18). Yüksek miktarda tuz, şekerli içecekler, sebze, meyve ve tam tahıl tüketiminin az miktarda olduğu beslenme tarzı inme ile ilişkili risk faktörü olarak bildirilmiştir (28). Günlük 2300 mg'dan daha fazla sodyum tüketmek inme riskini %23 artırmakla beraber günlük potasyum alımındaki her 1000 mg'lık artış riski %11 oranında azalttığı bulunmuştur (41).

7) Fiziksel İnaktivite: Fiziksel olarak aktif olan kişilerde inme insidansı ve inmeye bağlı mortalite, hareketsiz yaşamı olan bireylere göre daha düşüktür (42). Fiziksel aktivitedeki artış hipertansiyon, AF, hiperlipidemi, DM/bozulmuş glikoz metabolizması ve obezite gibi tanımlanmış risk faktörlerinin kontrolünde olumlu etkiler gösterdiği gibi biyolojik olarak plazma fibrinojen, homosistein ve platelet aktivitesini azaltarak da olumlu etkide bulunmaktadır (18, 43).

8) Apolipoprotein B/A1 Oranı: İskemik inme için güçlü bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Apolipoproteinler, lipoproteinlerin spesifik taşıyıcı molekülleridir. Apolipoprotein A1, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'in taşıyıcı proteini iken apolipoprotein B HDL dışındaki bütün lipoproteinlerin başlıca taşıyıcı proteinidir. Yüksek apolipoprotein A1 düzeyleri iskemik inme riskini azaltmaktadır. Buna karşılık apolipoprotein B düzeyinin yüksek olması inme riskini artırmaktadır. Apolipoprotein B/A1 tüm aterosjenik lipoproteinlerin iyi bir göstergesi olarak kabul edilmekte olup bu oran arttıkça inme riski de artmaktadır (18).

9) Abdominal Obesite (bel/kalça oranı): Bel/kalça oranı iskemik inme için güçlü bir risk faktörüdür. Bel/kalça oranının kadınlarda 0.85'in erkeklerde 0.90'ın üzerinde olması patolojik değerler olarak tanımlanmıştır ve bu oranın artışı bel çevresi viseral yağ dokusunun artmış olduğunu göstermektedir (26). Bu bölgeden salgılanan ve yüksek aterosklerotik risk oluşturan inflamatuvar sitokinler inme riskini artırmaktadır (26).

10) Psikososyal Nedenler: Depresyon varlığı inmeye bağlı ölüm, total inme ve iskemik inme riskini artırmaktadır (44). Yüksek düzeyde anksiyete semptomlarının varlığı, psikososyal streslerin (devamlı ev ve iş stresinin varlığı, stresli yaşam olayları gibi) olması artmış inme ve inmeye bağlı ölüm riskiyle ilişkili bulunmuştur (45, 46).

Tablo 2.1. İskemik İnmede Risk Faktörleri (18).

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	Değiştirilebilir Risk Faktörleri	
Yaş	Hipertansiyon	Hava kirliliği
Cinsiyet	Diabetes Mellitus	Dislipidemi
İrk/Etnisite	Kardiyak Nedenler	Prediyabet
	Sigara	Metabolik Sendrom
	Alkol	Obesite
	Diyet	İnflamasyon
	Fiziksel İnaktivite	Enfeksiyon/Sepsis
	Bel/Kalça Oran	Böbrek Hastalıkları
	Apolipoprotein B/A1 Oranı	Uykuda Solunum Bozuklukları
	Psikososyal Nedenler	Asemptomatik Karotis Stenoza
		İlaç/Madde Kullanımı
Genetik		

2.1.4. Etiyolojik Sınıflama

İskemik inme, “Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment” (TOAST) çalışmasına göre etiyolojik olarak 5 alt gruba ayrılmıştır (47).

1. Büyük arter ateroskleroza (tromboz, emboli, hipoperfüzyon)
2. Kardiyoembolizm
3. Küçük arter oklüzyonu (laküner infarktlar)
4. Belirlenen diğer nedenlere bağlı inme
5. Nedeni belirlenemeyen inme (iki veya daha fazla neden, negatif değerlendirme, tamamlama- mayan değerlendirme)

Büyük arter ateroskleroza

Tüm iskemik inmelerin %50'sinin nedenidir. İskemik inme, ekstrakranial ve majör intrakranial arterlerin belirli bölgelerindeki aterosklerotik lezyonlar sonucu ortaya çıkar (48).

Bu tip inmelerde infarkt, genellikle varolan aterom plaklarının stabiliteilerinin bozulmasıyla lezyon üzerine oturan trombüs yoluyla veya bazen aterom plağı büyüyerek arter lümeninde yol açtığı stenoz/oklüzyona bağlı olarak gelişmektedir. Ayrıca infarkt, aterotrombotik lezyondan kopan trombüs veya plak parçacıklarının distal arterde embolizasyonu sonucu da gelişebilmektedir (48).

Aterotrombotik beyin infarktı tanısı ateroskleroza bağlı olduğu düşünülen arteriyel stenoz/oklüzyonun doppler-ultrasonografi, BT/MR anjiyografi gibi non-invazif veya konvansiyonel anjiyografi gibi invazif incelemeler kullanılarak varlığının kanıtlanması ve diğer olası inme nedenlerinin dışlanmasıyla (kardiyoembolik nedenler gibi) konulmaktadır (48).

Kardiyoembolizm

Tüm iskemik inmelerin %20'sini oluşturur. İnme, kalpten kaynaklanan embolilerle oluşan arteriyel oklüzyon sonucu meydana gelmektedir (48). Non-valvüler AF, akut miyokard infarktüsü, geç dönemde miyokard infarktüsü (anevrizma, akinetik segment vb.), atriyal fibrilasyon ile birlikte yada tek başına romatizmal kalp hastalığı, protez kalp kapakçığı, hasta sinüs sendromu, sol atrial trombus/miksoma, sol ventriküler

trombüs/miksoma, dilate kardiyomiyopati ve infektif endokardit emboli kaynağı olabilecek başlıca kalp hastalıkları arasında yer alır (48).

Kardiyembolizme bağlı inme tanısı konulabilmesi için kardiyak emboli kaynağının gösterilmesi ayrıca diğer muhtemel inme nedenlerinin klinik ve radyolojik olarak yeterli incelemelerle dışlanmış olması gerekmektedir (48).

Küçük damar oklüzyonu (laküner infarktlar)

Tüm İskemik inmelerin %25'ini oluşturan bu inme alt tipinde tanı klinik olarak klasik laküner sendromlardan birinin varlığı (saf motor hemiparezi, ataksik hemiparezi, sensorimotor veya saf duyuusal inmeden biri), BT veya MR ile 20 mm'den küçük, derin infarkt görülmesi veya incelemelerin negatif kalması ayrıca büyük damar ateroskleroza, kardiyembolizm gibi diğer muhtemel iskemik inme nedenlerinin yeterli incelemelerle dışlanması ile konulmaktadır (48).

Belirlenen diğer nedenlere bağlı inme

İskemik inmelerin %5'inden daha azını oluşturan bu grupta; arteriyel diseksiyon, fibromusküler displazi, hematolojik hastalıklar, santral sinir sisteminin primer ve sekonder vaskülitleri, serebral otozomal dominant arteriyopati ile subkortikal infarktlar ve lökoensefalopati (CADASIL) ve serebral amiloid anjiopati gibi nadir küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları ve mitokondriyal hastalıklar inme nedenidir (48). Bu grupta yer alan etyolojilerde tanı için hastalığa spesifik detaylı hematolojik, biyokimyasal, anjiyografik, genetik testlerin yapılması ayrıca muhtemel kardiyembolizm ve büyük damar aterosklerozunun dışlanmış olması gerekir (48).

Nedeni belirlenemeyen inme

Ayrıntılı tetkiklere rağmen nedeni saptanamayan, yeterli incelenemeyen veya iki ya da daha fazla olası nedeni bulunan inmeler bu grupta yer alır (48).

2.1.5. Klinik Sınıflama

“Oxfordshire Community Stroke Project” (OCSP) çalışmasında iskemik inme, nörolojik bulgulara göre (motor/duyuusal, kortikal bulgular ve hemianopsi) sendromik olarak 4 alt grup olarak sınıflanmıştır (49):

1. Total anterior sirkülasyon infarktları (TACI)
2. Parsiyel anterior sirkülasyon infarktları (PACI)

3. Posterior sirkülasyon infarktları (POCI)

4. Laküner infarktlar (LACI)

TACI Sendromu: a.carotis interna veya a.cerebri media'nın proksimalde oklüzyonu sonucu anterior (karotis) sulama alanına ait büyük infarktlara bağlı olarak; akut gelişen hemiparezi (duyu kusuru var veya yok), afazi, ihmal gibi yüksek kortikal fonksiyon bozukluğu ve homonim hemianopsi bulgularının tümünün birlikte olduğu klinik durumdur (49).

PACI Sendromu: Anterior (karotis) sulama alanına ait ama TACI'ye göre daha sınırlı (a. cerebri media dallarından biri veya a. cerebri anterior oklüzyonu sonucu) infarktlara bağlı olarak; TACI sendromunu oluşturan motor/duyusal, kortikal bulgular ve hemianopsi bulgularından sadece ikisinin saptanması veya motor/duyusal bulguların bir vücut parçasında sınırlı kalması (monoparezi gibi) veya yeni gelişmiş izole yüksek kortikal disfonksiyon bulgusunun (izole afazi gibi) olduğu klinik durumdur (49).

POCI Sendromu: Vertebrobaziler sistemden beslenen oksipital loblar ile beyinsapı ve serebellum infarktlarına bağlı olarak hemianopsi, beyinsapı bulguları ve serebellar bulgularının herhangi bir kombinasyonunun bulunduğu durumudur (49).

LACI Sendromu: Genellikle kapsüla interna, bazis pontis gibi motor ve duyusal iletileri taşıyan liflerin sıkışık bir şekilde bir arada bulunduğu bölgeleri sulayan penetran arterlerden sadece birinin tıkanmasına bağlı olarak gelişen küçük, derin infarktlara bağlı olarak kortikal bulgular ve hemianopsinin olmadığı, motor ve/veya duyusal bulguların yüz, kol ve bacağın hepsini veya en azından ikisini içerecek şekilde tutmasıyla oluşan klinik durumdur (49).

2.1.6. Serebral Kan Dolaşımın Özet Anatomisi

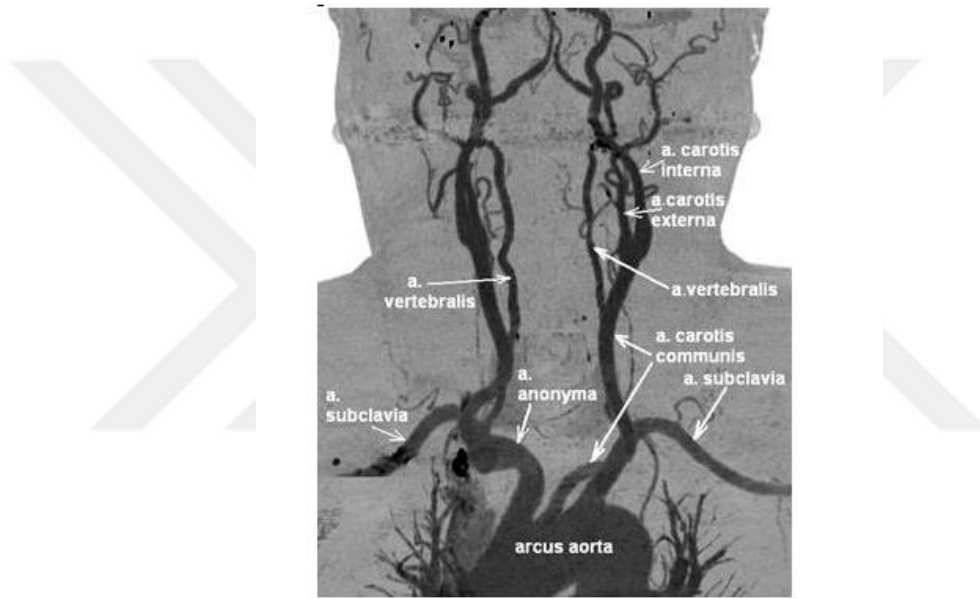
Beyni besleyen karotis ve vertebral arterler arkus aorta ve dallarından köken alır (50).

a) Karotis Sistemi

Beynin anterior kısmını besleyen internal karotid arter (ICA), solda direkt arkus aortanın dalı olarak ayrılan fakat sağda trunkus brakiosefalikustan çıkan carotis communis arter (CCA)'in bir dalıdır. Carotis communis arter, dördüncü servikal vertebra düzeyinde external karotid arter (ECA) ve ICA olmak üzere iki dala ayrılır. ICA, kafa tabanında karotis kanalına girer. ICA, servikal bölgede dal vermemektedir. İntrakraniyal

bölgede karotis kanalından çıktıktan sonra kavernöz sinüsün içine girer. Kavernöz bölge çıkışında ICA üç temel dalını; oftalmik arter, posterior komünikan arter (PCoA) ve anterior koroidal arter (AChA)'i verir. Supraklinoid karotis interna frontobazal bölgede anterior serebral arter (ACA) ve orta serebral arter (MCA) olmak üzere iki uç dala ayrılır. Her iki ACA anterior komünikan arter (ACoA) vasıtasıyla birleşirler.

ICA ile iki uç dalına (ACA ve MCA) ve PCoA birlikte “ön sistem” adı verilir. Oksipital lob dışında kalan frontal ve parietal loblar, temporal lobun lateral kısmı, derin serebral yapılar ön sistem tarafından beslenir (50). Arkus aorta ve çıkan dalları şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Arkus aorta ve dalları (51).

b. Vertebrobaziller Sistem

Vertebrobaziller sistemin kan dolaşımı subclavian arterin dalı olan vertebral arter (VA)’ler tarafından sağlanmaktadır. Subclavian arter sağda CCA’da olduğu gibi brakiosefalik trunkustan, solda ise doğrudan arkus aortadan ayrılmaktadır. VA, subclavian arterden ayrıldıktan sonra beşinci/altıncı servikal vertebraların transvers foramenleri içine girerek birinci servikal vertebra düzeyine çıkar. Vertebral arterin intradural segmentinden serebellumun alt bölümünü sulayan posterior inferior serebellar arter (PICA) çıkar.

Her iki vertebral arter ponsun ön yüzünde orta hatta bulunan baziller sulkusun kaudalinde birleşerek baziller arteri oluşturur. Baziler arter beyin sapı boyunca beyin

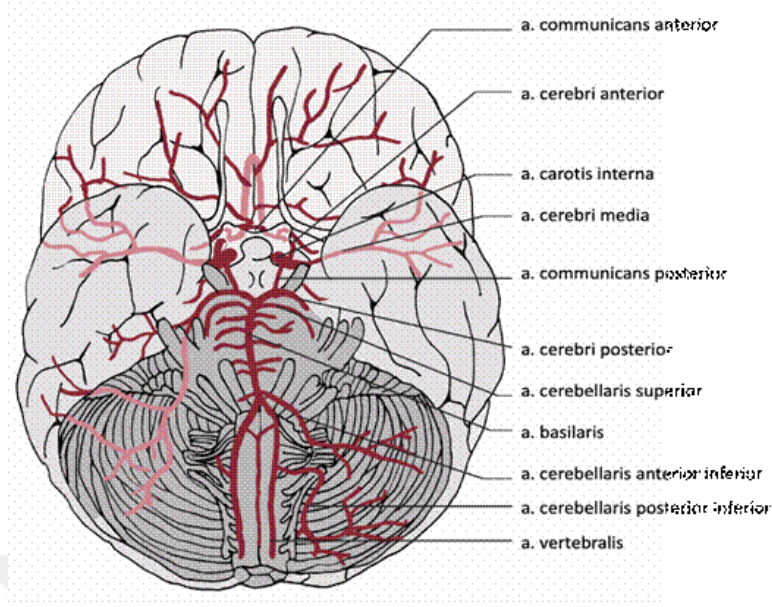
sapının ön orta bölümünü sulayan kısa perforan dallar ile beyin sapını çevreleyen kısa ve uzun sirkumferensiyal dallar verir. Baziler arterden ayrılan uzun sirkumferensiyal arterler, anterior inferior serebellar arter (AICA) ve superior serebellar arter (SCA) adını alır. Baziler arter uç kısmında her iki posterior serebral arter (PCA)'i vererek sonlanır. Vertebrobaziler sistem, infratentoriyel bölgede yer alan beyin sapı, serebellum, temporal lobun mediali, oksipital lob ve talamusun bir kısmını besler (50).

3. Willis Poligonu

Willis poligonu; intrakraniyal bölgede her iki karotis sistemi ayrıca vertebrobaziller sistem ile karotis sistemi arasında gerektiğinde devreye giren kollateral dolaşımın meydana getirdiği oluşumdur . Willis poligonu önde MCA, her iki ACA ve bunlar arasında anastomuzu sağlayan ACoA ile arkada PCoA ve PCA'dan oluşur. Beyinde başlıca 3 grup anastomatik bağlantı vardır:

- 1- **İntrakraniyal anastomozlar:** Kortikal düzeyde serebral arterler arasında anastomozlar bulunmaktadır. Ayrıca serebellumda; superior, anterior, inferior ve posterior serebellar arterler arasında anastomozlar mevcuttur.
- 2- **Ekstrakraniyal-intrakraniyal anastomozlar:** ECA'nın dalı olan internal maksiller arter ile oftalmik arter arasında, ECA'nın meningeal ve etmoidal dalları ile serebral arterlerin leptomeningeal dalları arasındadır.
- 3- **Ekstrakraniyal anastomozlar:** Servikal bölgede VA ile ECA arasında bulunur (50).

Willis poligonunun kafa tabanından görünümü şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Willis poligonunun kafa tabanından görünümü (51).

2.1.7. Serebral İskemide Fizyopatoloji

Beyin, metabolik ihtiyacı yüksek buna karşılık kendi oksijen ve glikoz rezervi düşük olan bir organdır. Fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünü sürdürebilmek için oksijen ve glikoz içeriği yeterli ve kesintisiz bir kan akımına ihtiyaç duyar. Beyin için gerekli sabit oksijen ve glikozun karşılanması için beyin kan akımı 40-60 mL/100 g/dk olmalıdır (52, 53).

Fizyolojik koşullarda, otoregülasyon olarak adlandırılan mekanizma ile arteriyel kan basıncı ve kafa içi basınç değişiklikleri karşısında beyin kan akımının sabit kalması ve kesintisiz sürdürülebilmesi sağlanır. Bu mekanizma sayesinde sistemik ortalama arter basıncı 60 ile 160 mm Hg değerleri arasında kaldığı sürece beyin kan akımının sabit kalması sağlanır (52).

Beyin kan akımı 30 dakika boyunca 20-25 ml/100 g/dk altına düştüğünde nöronlar fonksiyonlarını sürdüremez hale gelir ancak bir süre için de olsa canlıdırlar. Fakat kan akımı 10 ml/100 gr/dk altına düştüğünde hücre ölümü başlar (54). Serebral iskemide global veya fokal olabilir. Global iskemide kan dolaşım tekrar sağlandığında beyin iskemide daha duyarlı olan yapılarında (hipokampus, striatum, serebellum, korteks nöronları gibi) selektif olarak nöronal ölüm görülür. Fokal serebral iskemide ise beyin bir bölgesini sulayan damar trombotik veya embolik natürde bir pıhtı ile tıkanır.

Penumbra kendi haline bırakıldığında kısa süre içinde infarkt dokusuna dönebilecek nitelikte dinamik bir dokudur. Bu dokunun enerji metabolizmasında, hücrenin canlılığını korumaya yeten buna karşılık fonksiyonlarını yerine getirmesi için yeterli olmayan bir bozukluk meydana gelmektedir (50, 56).

[illegible]

14

2.1.8. Serebral İskemide Patofizyoloji

İskemik inme patofizyolojisinde moleküler düzeyde iskemiyle birlikte başlayan, saatler veya günler boyu süren son derece karmaşık mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar eş zamanlı veya birbirini izleyerek gelişir ve kendi içinde neden-sonuç ilişkisi bakımından farklı etkileşimler gösterir. Bu mekanizmaların bazıları nöroprotektif etki gösterir, bazıları da tam tersi nöronal hasarı ağırlaştırır. Bazen de aynı mekanizma iskemi sonrası hiperakut, akut, subakut veya kronik dönemde çıkışına göre iskemik nöronlarda zıt etki gösterebilmektedir.

İnme patogenezi nöronlar, astrositler, oligodendrositler, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, bazal membran ve ekstrasellüler matriks arasındaki tüm etkileşimleri içeren bir nörovasküler ünite konsepti şeklinde ele alınmalıdır (41, 57).

Akut iskemik inme patogenezinde rol oynayan mekanizmalar şunlardır (56-60):

- Hipoperfüzyon/biyoenerji yetmezliği
- Glutamat eksitotoksitesi/kalsiyum sitotoksitesisi
- Oksidatif stres
- İnflamasyon
- Kan beyin bariyerinin bozulması
- Otofaji
- Apoptoz

2.1.8.1. Serebral Hipoperfüzyon/Biyoenerji Yetmezliği

İskemik inmeye yol açan etyoloji ne olursa olsun sonuç arter oklüzyonudur ve buna bağlı gelişen hipoperfüzyon patogenezin ilk basamağını oluşturur. Kritik eşik değerin altına düşen beyin kan akımı sonucu uzamış iskemi ve hipoksi; nöronların anaerobik mekanizmaları kullanmalarına, enerji bağımlı iyon transport pompalarındaki (Na^+/K^+ ATPaz gibi) bozukluklara bağlı iyon dengesizliklerine yol açar (4, 21, 61).

Nöronlarda ATP kesilmesine bağlı sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişi, potasyumun hücre dışına çıkışıyla iskemik depolarizasyon başlar (21, 60, 62). Membran depolarizasyonu fosfolipazlar, proteazlar, endonüklazların aktivasyonuna, glutamat salınımının artmasına ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açar (60). Kısa süreli iskemik depolarizasyonda (1-2 dakika gibi) nöron kurtulur. İskemik depolarizasyon 5-30

dakika arasında sürer ve reperfüzyon sağlanırsa nöron repolarizasyonu ve metabolizmasında bazı geri dönüşler olabilmektedir. Bununla birlikte hücrenin yaşaması veya ölmesine yol açabilen saatler/günler sürebilen moleküler düzeyde mekanizmalar tetiklenmiş olur. Eğer iskemik depolarizasyon 30 dakikadan daha uzun sürerse reperfüzyon sağlansa dahi nöron ölümü olmaktadır (62).

2.1.8.2. Glutamat Eksitotoksitesi/Kalsiyum Sitotoksitesi

Eksitotoksite, eksitator aminoasitlerin iskemik beyinde aşırı miktarda salınımına bağlı gelişen nöronal hasar demektir (62). Glutamat ve aspartat başlıca eksitator aminoasitler olmakla birlikte memeli beyinde ana eksitator nörotransmitter glutamattır. Glutamat hücreler arası sinyalizasyonda, nöronal plastisitede, proliferasyonda, hücrenin yaşaması ve ölmünde önemli rol oynamaktadır (57).

Nöronal ve glial depolarizasyonla birlikte presinaptik voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aktive olarak presinaptik uçtan ekstrasellüler aralığa aşırı bir glutamat salınımına yol açar (21, 44). Buna ilaveten, enerji bağımlı diğer bir süreç olan presinaptik aminoasitlerin geri alım mekanizmalarının da bozulması sonucu ekstrasellüler alanda glutamat birikimi daha da artar (57, 62).

Glutamatın 3 tip reseptörü bulunmaktadır; N-metil-D-aspartat (NMDA), amino-3-hidroksi-5-metiloksazol-4-propiyonik asit (AMPA) ve kainik asit reseptörleri. Glutamatın birikimiyle birlikte bu reseptörlerin aşırı uyarılması iskemi sırasında nöronların ölümüne yol açan kompleks patolojik sürecin işlemesine yol açar (58, 59). Aşırı glutamat salınımının patofizyolojik karşılığı intrasellüler kalsiyum ve sodyumun artması, potasyumun ise ekstrasellüler aralıkta artmasıdır. Hücre içi aşırı kalsiyum birikimi mitokondriyal disfonksiyon yol açarak oksidatif stresle hücrede yapısal hasara neden olan serbest radikaller ve nitrik oksit (NO) salınımına neden olmaktadır (57-59). Glutamatın aşırı salınımı hücre ölümüne yol açmaktadır. Glutamata bağlı eksitotoksik hücre ölümü; ya AMPA reseptörlerinin aktivasyonu ile kalsiyumun yanı sıra sodyum ve klorun hücre içine girişiyle birlikte dakikalar veya saatler içerisinde oluşan akut eksitotoksositeye bağlı gelişir veya aktive NMDA reseptörü aracılığıyla 16-24 saat içinde kalsiyumun hücre içine girmesine bağlı gecikmiş eksitotoksosite şeklinde olur (62-64).

2.1.8.3. Mitokondriyal Hasarın Patogenezdeki Rolü

Glutamat eksitotoksitesinin yol açtığı hücre içi kalsiyum birikimi, nöronun şişmesi ve hücre organellerinde özellikle mitokondri ve endoplazmik retikulumda morfolojik ve fonksiyonel bozukluklara yol açar (4). Mitokondri, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, çift membranla çevrili, elektrokimyasal gradient içinde organik substratlardan hücre için gerekli enerjiyi sentezleyen önemli bir organeldir (65). Mitokondri, hücrede metabolizma, redoks dengesinin sağlanması, kalsiyum homeostazisin düzenlenmesi, hücre çoğalması, nekroz, apoptoz ve nekroptoz gibi hücre ölümü ile ilgili birçok kritik hücre fonksiyonlarına sahiptir (20, 65-67).

Mitokondri aynı zamanda hücre içi serbest oksijen radikallerin (ROS) ana kaynağıdır. Mitokondriyal ROS üretim yolu mitokondriyal solunum zincir kompleksi tarafından düzenlenir.

Mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS) çoklu-enzim komplekslerinden (kompleks I-V) oluşmaktadır; proton-pompa enzim kompleksi I (NADH, koenzim Q), süksinat dehidrogenaz (kompleks II), koenzim Q-sitokrom C redüktaz (kompleks III), sitokrom C oksidaz (kompleks IV) ve ATP sentaz (kompleks V). Kompleks I, oksijenden ROS üretiminden sorumludur (20, 66, 68).

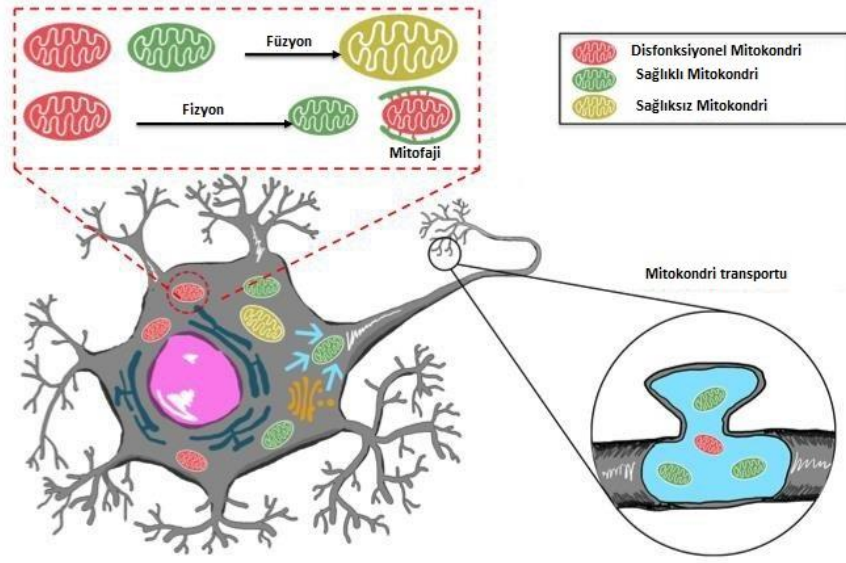
Eksitotoksiteye maruz kalan hücrede, hücre içi kalsiyum artışı mitokondrinin permabilitesini bozmaktadır. Permeabilitesi bozulan mitokondrinin matriksi su alarak şişmeye başlar. Bu durum mitokondride depolarizasyona yol açar. Buna bağlı mitokondride oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi bozulur. Bu fonksiyonel bozukluk ROS üretimini arttırdığı gibi yarattığı enerji yetmezliği direkt olarak hücre apoptozisini tetikleyebilmektedir (10, 20). Artan ROS üretimi ve aktive olan lipazlar, proteazlar, endonükleazlar DNA, protein ve lipidlerin yapısında değişikliklerle nöronal ölüme yol açabilen diğer mekanizmaları tetikleyebilmektedir (59).

Normal büyüme süreçlerinde ve stres durumlarında hücre içi metabolik denge ve hücre yaşama için gerekli olan otofajinin mitokondriyal karşılığı olan mitofaji; iskemi ve reperfüzyon durumunda oksidatif/nitratif stresle yapısal bütünlüğü bozulan mitokondrilerde apoptozisten koruyucu olabileceği gibi tam tersi bir etki ile nöronal ölüme de yol açabilmektedir (20).

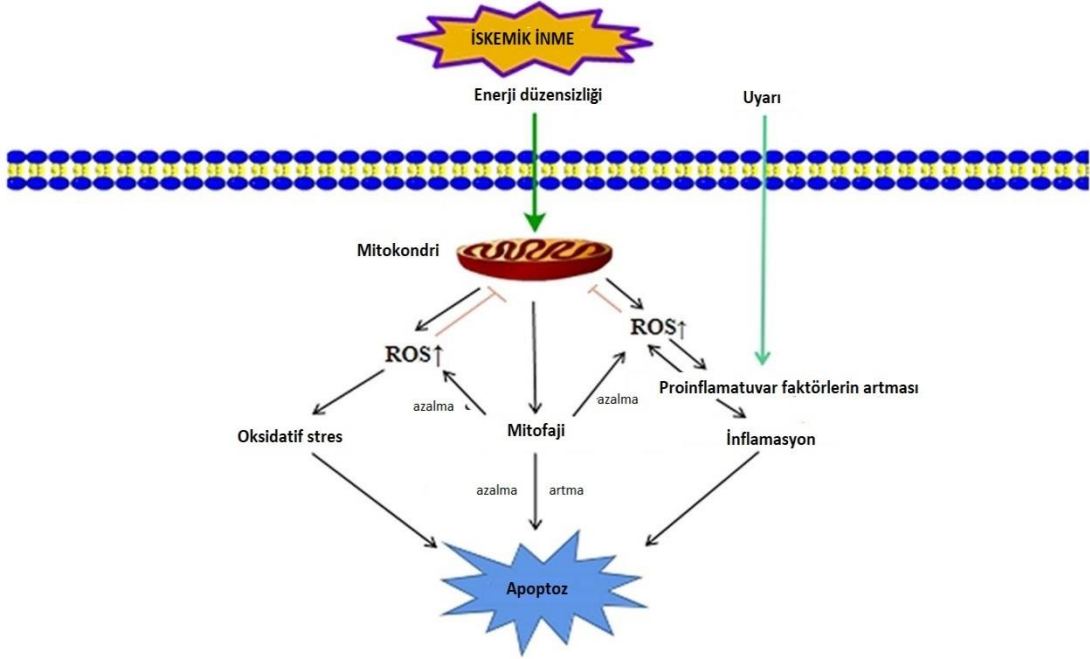
Mitofaji

Mitofaji, otofajinin mitokondrilerdeki selektif şeklidir. Mitokondriyal metabolizmanın sağlıklı bir şekilde korunabilmesi için hasarlı ve fonksiyonunu yitirmiş mitokondrilerin lizozomda parçalanması sürecidir (67). İskemi sonrası oluşan oksidatif stres ve ROS'dan biri olan NO'e bağlı gelişen nitratif stres, protein birikimine yol açarak mitokondride morfolojik bütünlüğü sağlayan füzyon ve fragmentasyon (füzyon ve fizyon) mekanizmaların bozulmasına neden olur. Füzyon mekanizması hafif hasarlı mitokondrinin tamir edilmesi ile ilişkilidir. Fragmentasyon (ayırıştırma) ise mitokondrilerdeki hasarlı kısımların onarılması suretiyle mitokondrilerin yeniden işlevsellik kazandırılmasıyla ilişkili mekanizmadır. Ağır hasarlı olan ve yapısal olarak düzeltilmeyecek mitokondriler mitofaji ile ortadan kaldırılmaktadır (20, 67). Şekil 2.4'te nöronda mitokondrideki füzyon ve fragmentasyon süreci gösterilmiştir.

İskeminin erken döneminde mitofaji hasarlı mitokondrilerin temizlenmesine katkıda bulunmaktadır. Mitokondriyal hasar, serebral I/R hasarında mitofaji ve apoptozu regüle edebilmektedir (67). İskemi sonrası mitokondriyal permabilitenin derecesi mitofajide temel belirleyicidir. Hafif hipokside mitokondrinin sınırlı bir kısmındaki permabilite artışı (yani kısmen hasarlı mitokondri) mitofajiyi aktive etmektedir. Bu süreçteki aktivasyon, proteinlerden enerji üretimini sağladığı gibi hasarlı mitokondrilerin uzaklaştırılması yoluyla hücrelerde koruyucu bir rol oynamaktadır (67). Ağır hipoksi durumunda mitofaji hasarlanan mitokondriyi temizlemekte yetersiz kalmakta ve mitofaji sistemi hiperaktif hale gelmektedir. Bu durum apoptozla ilişkili regülatör proteinlerin aktivasyonu ile apoptoz sürecini kolaylaştırmaktadır. Mitofaji iskemide apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyonda rol almaktadır (67). Şekil 2.5'te mitofajinin nöropatogenezdeki rolü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Nöron içinde mitokondrideki füzyon ve fregmantasyon süreci (65).



Şekil 2.5. Mitofajinin nöropatogenezdeki rolü (67).

2.1.8.4. Oksidatif Stres

İskemik inmede nöronal hasarın oluşmasında oksidatif stres temel patofizyolojik mekanizmalardan biridir. Oksidatif stres; dokuda oksidan ve serbest radikaller aracılı

antioksidan dengenin bozulmasına bağlı meydana gelen hasar durumudur (69). İskemi, iskemi/reperfüzyon, bazı ilaçların kullanımı, radyasyon maruziyeti, nörodejeneratif hastalık süreci gibi endojen hücrel antioksidan kapasitenin aşıldığı durumlarda oksidatif stres meydana gelir (70).

Serbest radikaller, kimyasal olarak oksijenin kısmen indirgenmiş reaktif formlarıdır. Bu moleküllerin dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron bulunmaktadır. Kimyasal kararlılığa ulaşmak için çevrelerinde bulunan ve tepkimeye girdiği nükleik asitler, karbonhidrat bileşenleri, proteinler, hücre membran lipidleri gibi pek çok hedef hücrel molekülün yapısında biyokimyasal değişimlere yol açarak ciddi doku hasarının gelişmesine neden olurlar (70, 71). Başlıca serbest oksijen radikalleri (ROS) içinde süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksit (NO) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) sayılabilir.

Fizyolojik koşullarda ROS, tüm hücrelerde (normal hücrel metabolizma sırasında) oksidasyon reaksiyonları sırasında belli miktarda ara ürün olarak oluşurlar (64, 70). ROS'un düşük-orta derecede konsantrasyonları, kalsiyum dengesi başta olmak üzere çeşitli hücre içi sinyal iletimi, hücrel proliferasyon, çeşitli gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ve apoptoz gibi hücre içi ve doku homeostazisinin sağlamlasında önemli rol oynar (70). Fizyolojik koşullarda tüm aerobik organizmalarda endojen ve ekzojen kaynaklı serbest radikal aracılı oksidatif strese karşı dokuyu korumak için hem enzimatik hemde non-enzimatik antioksidan özellikte serbest radikal temizleyicileri bulunmaktadır (62, 64, 72, 73). Bu antioksidan molekül ve enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirerek hücrel ROS seviyesinin düşmesini sağlamakta ve sonuç olarak hedef molekülü oksidatif hasardan korumaktadır (62, 72, 74).

Bazı endojen enzimatik antioksidanlar şunlardır;

- Süperoksit dismutaz
- Glutasyon peroksidaz
- Glutasyon redüktaz
- Katalaz
- Sitokrom oksidaz
- Peroksiredoksin
- Epoksit hidralaz

- NADPH Kinon Oksidoredüktaz
- İzositrat dehidrogenaz

Bazı endojen non-enzimatik antioksidanlar şunlardır;

- Glutasyon
- Koenzim Q
- Sistein
- Melatonin
- Ürik asit
- Albumin
- Bilirubin
- Transferrin
- Seruloplazmin
- α-lipoik asit
- Hemoglobin
- Myoglobin

Bazı ekzojen antioksidanlar şunlardır;

- Vitamin E (α-tokoferol)
- Vitamin A (β-karoten)
- Vitamin C (askorbik asit)
- Vitamin B9 (folik asit)

Serbest Oksijen Radikallerin (ROS) Biyokimyasal Özellikleri

Serbest oksijen radikallerinin kimyasal yapısı şekil 2.6'da, ROS'ların üretim ve enzimlerle dektoksifiye olma süreçleri şekil 2.7'de gösterilmiştir.

a) Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Bu radikal, moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmesiyle oluşur. Başlıca kaynağı mitokondridir (75). Süperoksit radikali; biyolojik membranlardan geçişi sınırlı ve sentezlendiği yerden fazla uzağa diffüze olamayan bu nedenle sentezlendiği yerde

tepkimeye giren bir radikaldır (76, 77). Moleküler düzeyde kendisi direkt olarak fazla zarar vermeyen bir serbest radikaldır. Asıl önemi sekonder olarak H_2O_2 ve hidroksil radikalleri gibi daha güçlü serbest radikallerin kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (78).

Süperoksit ve H_2O_2 kendileri zayıf radikaller olmalarına rağmen demir gibi elementlerin varlığında daha güçlü reaktiflere (hidroksil radikalleri gibi) dönüşerek hücre hasarını artırır.

Süperoksit radikali mitokondride ATP sentezlenirken elektron transport zincirinden geçen oksijenin bir kısmından NADPH oksidaz enzimi yardımıyla sentezlenir. Süperoksit düzeyleri arttığında, endojen bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile daha stabil bir form olan H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek düzeyi azaltılır. Oluşan H_2O_2 ise katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer peroksidazlarla H_2O 'ya kadar bölünebilmektedir. Böylece süperoksit radikalının hücresel düzeyi kontrol altında tutulur (78). Beyin dokusunda önemli miktarda bulunan NADPH oksidaz iskemik koşullarda artarak büyük oranda süperoksit oluşumuna neden olmaktadır (79). Buna ek olarak, demir iyonu tarafından Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'den hidroksil radikale dönüşmektedir (Şekil 2.9). Süperoksit miktarındaki artış birçok hücresel yapıyı doğrudan veya dolaylı yoldan etkileyerek hücre büyümesinin engellenmesi, mutagenizasyon ve hücre ölümüne neden olur (80).

b) Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2)

Süperoksit dismutaz serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir enzimdir. Oksidatif hasarla artan süperoksit radikali SOD enzimi sayesinde H_2O_2 dönüştürülür. Hidrojen peroksit, süperoksit gibi sentezlendiği yerde kalmayan tam tersine membranları geçerek sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan yapıdadır. Hidrojen peroksitin moleküler düzeyde asıl zarar verici özelliği süperoksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturmak için kolaylıkla yıkılabilir olmasıdır. Hidrojen peroksit aynı zamanda serbest demir ile de reaksiyona girebilme potansiyeline sahiptir. Bu reaksiyonun sonucunda demir okside olurken hidroksil radikali ortaya çıkar. Hidroksil radikal en reaktif ve zarar verici olduğu bilinen radikallerden biridir (77).

c) Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\bullet$)

Bilinen en reaktif serbest radikaldır. Demir veya bakır (Cu) gibi geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksit toksik hidroksil radikaline dönüşür. Yine bir geçiş metalinin varlığında süperoksit radikali, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali hücre içinde bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. Diğer serbest radikaller gibi DNA'yı, lipidleri, karbonhidratları ve proteinleri zedeleyebilmektedir (80).

d) Peroksinitrit (ONOO^-) ve Nitrik Oksit (NO) Radikalleri

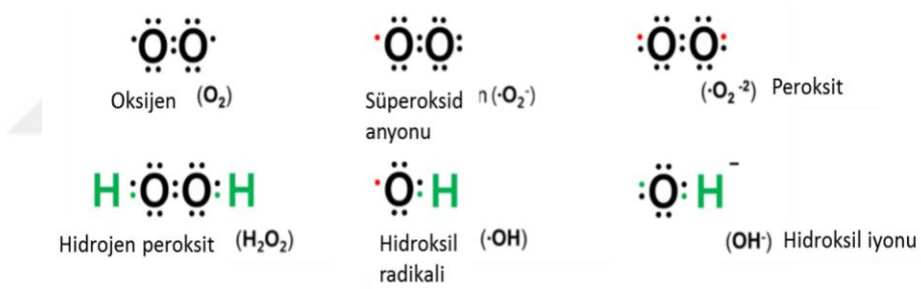
Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri aracılığıyla L-arjininden üretilen bir serbest radikaldır. NO, dokularda yaygın olarak bulunur ve gaz yapısında bir radikaldır. Normal koşullarda NO, kan basıncı ve vasküler tonusun düzenlenmesi, sinaptogenez/sinaptik plastisite, anjiyogenez, lökosit adezyonu, trombosit agregasyonu ve nörotransmisyonun düzenlenmesinde fizyolojik etkileri vardır (62, 64, 81, 82).

Hücrel kökenlerine göre nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenen (iNOS) olmak üzere üç çeşit NOS izoformu vardır. Bunlardan iNOS makrofaj, mikroglia ve diğer hücrelerden kaynaklanır. nNOS ve eNOS kalsiyum/kalmodulin kompleksine bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum artışıyla aktive olurlar. iNOS ise bundan bağımsızdır ve iskemide inflamasyon yanıtların oluşmasında rol alan NO'yu sentezler (59, 82). Aracı olan NOS'a göre NO'nun iskemik hasarı azaltıcı yada artırıcı etkisi vardır. Bazı mediatörlerle aktive olan eNOS endotel hücre içinde NO yapımını artırır. Burada yapılan NO düz kas hücrelerinde relaksasyon yaparak vazodilatasyon ve buna bağlı beyin kan akımı artışı sağlar. Sonuç olarak eNOS aracılı oluşan NO'nun iskemik hasarı azaltıcı etkisi vardır (59). Buna karşılık nöronlarda, astrositler, oligodendrositler, lökositler, endotel hücreleri ve perivasküler sinirlerde nNOS ve iNOS tarafından sentezlen NO, sentezlendikten sonra hızla difüzyonla yayılır ve bu hücrelerin yaygın uzantıları sayesinde diğer nöronlara yayılır. Bu yolla oluşan NO'nun iskemik hasarı artırıcı etkisi vardır (82). İskemi durumunda her üç NOS izoformunun da aktivitesi artar. Benzer şekilde süperoksit radikali de iskemi ve özellikle reperfüzyon durumunda artış gösterir (82). NO, süperoksit düzeylerinin arttığı bu gibi durumlarda süperoksit ile reaksiyona girerek güçlü oksidan bir molekül olan peroksinitriti oluşturur (82).

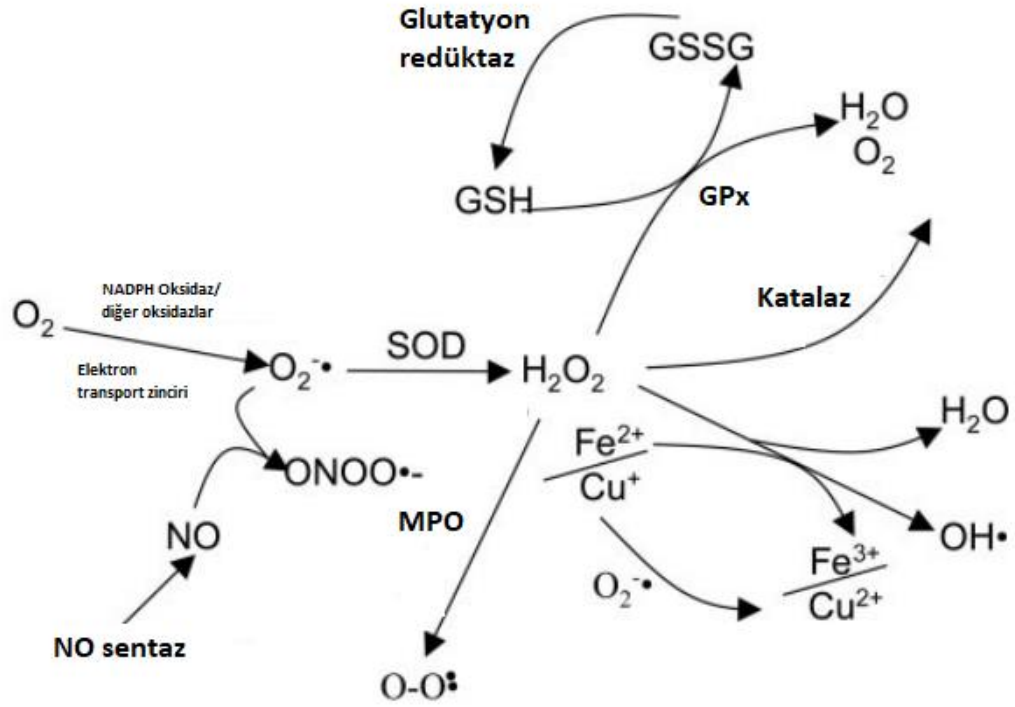
Nitratif Stres

Oksidatif stres ve serbest nitrat radikalleri (RNS) ile ilişkili nitratif stres serebral I/R sırasında tetiklenir. Sonuç olarak, H_2O_2 , süperoksit, hidroksil radikali gibi ROS ve NO, peroksinitrit gibi RNS sentezlenmesi artar (83). İskemik hasarda nitratif stres dengesi kan beyin bariyerinin bozulmasıyla yakın ilişkilidir. Nitratif stres, başlıca peroksinitrit ile indüklenir (58, 82). Süperoksit ve NO'nin birlikte olduğu her yerde peroksinitrit sentezlenmektedir. Yarı ömrü kısa olan bu molekül başlıca nitrat ve nitrite dönüşür. Perooksinitrit, hücre proteinlerinin denatürasyonu ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre iskeleti, DNA yapısında ve mitokondrilerde hasara neden olmaktadır (84).

Oksidatif/nitratif stres nöronal plazma membranında lipid peroksidasyonunu yaparak sekonder bir ürün olan malondialdehit (MDA) oluşunuma neden olur (83). Oldukça yüksek reaktif ürünler olan ROS, RNS ve MDA nöronal hücrelerde ağır hasara neden olurlar. Oksidatif stresin devam etmesi durumunda sinaptik plastisite dramatik bir şekilde bozulmaktadır (83).



Şekil 2.6. Serbest oksijen radikalleri (85).



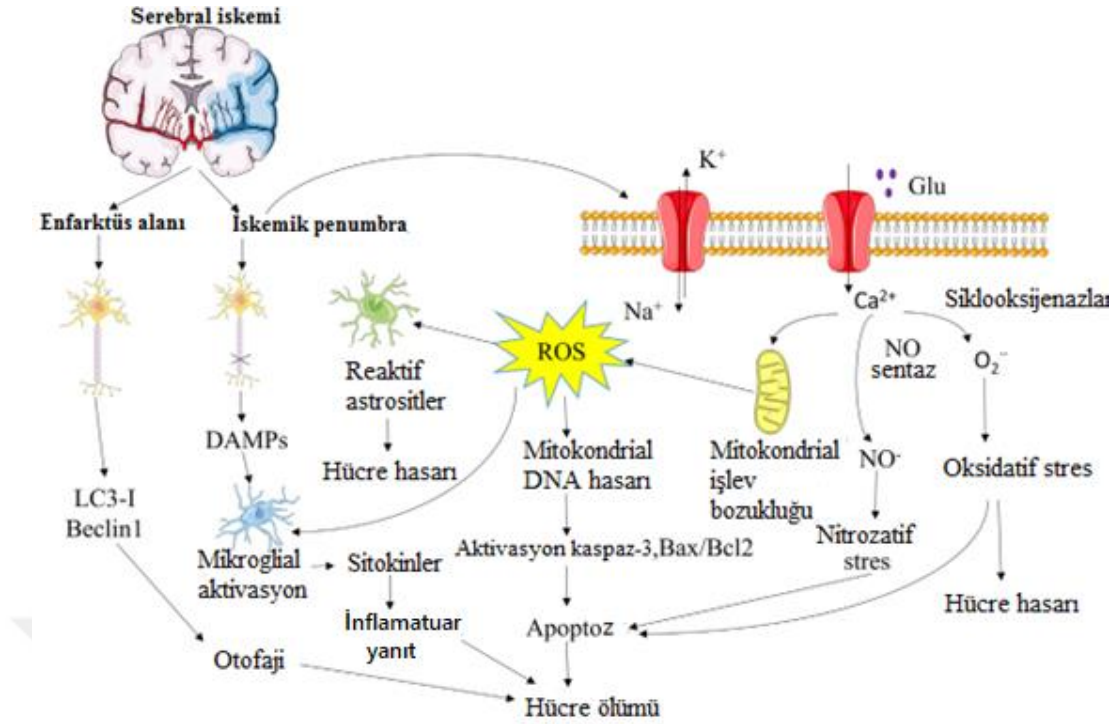
Şekil 2.7. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve enzimlerle detoksifikasyon süreci (86).

İskeminin İndüklediği Oksidatif Stresin Sonuçları

İskemi sonrası hücre içi ROS üretimi artmaktadır. Bu üretim; iskemi sonrası hücre içi kalsiyum artışına bağlı meydana gelen mitokondriyal hasarlanmadan ve iskemiye izleyen reperfüzyon sırasında dokunun oksijene fazla miktarda maruz kalmasından kaynaklanmaktadır.

Artmış ROS, mikroglia ve astrositlerin aktivasyona yol açarak sitokinlerin, kemokinlerin ve MMP salınımına neden olarak patogeneze rol oynayan diğer temel mekanizmalardan biri olan nöroinflamasyonun tetiklenmesi/artmasına neden olmaktadır (21, 69, 87).

ROS artışı, membran aracılığıyla iyon ve düşük moleküler ağırlıklı maddelerin geçişine yol açarak nekroza neden olmaktadır veya mitokondriyal DNA hasarı yaparak kaspaz 3, Bax/Bcl2 aktivasyonu ile hücreyi apoptotik götüren yolu aktive edebilmektedir (21, 69, 87). İskemi sonrası oksidatif stresin nöropatogeneze yeri şekil 2.8’de görülmektedir.



Şekil 2.8. İskemi sonrası nöropatogenezde rol alan mekanizmalar (69).

2.1.8.5. İskemi Sonrası Nöroinflamasyon

Serebral iskemi sonrası oluşan inflamatuvar yanıt oksidatif stres gibi nöronal hasara yol açan temel mekanizmalardan biridir. Kan akımının kesildiği andan başlayıp iskemik dokunun geç dönemde rejenerasyonu ile ilişkili sürece kadar iskemik kaskadın tüm aşamalarında yaşamsal rol oynamaktadır (21). İskemi sonrası nöroinflamatuvar yanıt; iskekiye yanıt olarak salgılanan ve hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMPs) olarak adlandırılan hasarla ilişkili moleküller, glial hücre aktivasyonu ve lökosit infiltrasyonu tarafından başlatılır (20). DAMPs molekülleri, iskemik çekirdekteki nekrotik hücrelerin DNA, RNA gibi sitoplazmik proteinleri, modifiye/okside edilmiş lipid ürünleri ve ekstrasellüler bileşenlerinden kaynaklanan ve inflamasyonu tetikleyebilen biyomolekülleri yansıtır (5, 69, 88). Başlıca DAMPs molekülleri arasında nöronal kromotinle ilişkili çekirdek proteini yüksek motiliteli grup kutusu 1 (HMGB1), purinler (ATP onların katabolizma ürünleri) ve ısı-şok protein 70 (HSP70) yer alır. Buna ilaveten yine hasarlanan nöronların ekstrasellüler matriksinden köken alan hyaluronik asid, fibronektin, kondritin sülfat proteoglikanlar gibi endojen DAMPs molekülleri immün sistemi dakikalar içinde aktive edebilmektedir (88, 89).

İskemi sonrası DAMPs molekülleri mikroglia, astrositler, perivasküler makrofaj ve endotel hücrelerinde bulunan çeşitli reseptörler [gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptör (RAGE), toll-like reseptörler (TLR) gibi] tarafından tanınmaktadır (5, 88). İskemi sonrası ilk olarak migroglial hücreler aktive olur (90). İskemiyle birlikte görülen enerjideki azalma, iyon konsantrasyonundaki farklılıklar ve değişen nöronal aktiviteye bağlı olarak mikroglial yanıt dakikalar içinde hem çekirdek hemde penumbra başlamaktadır (90).

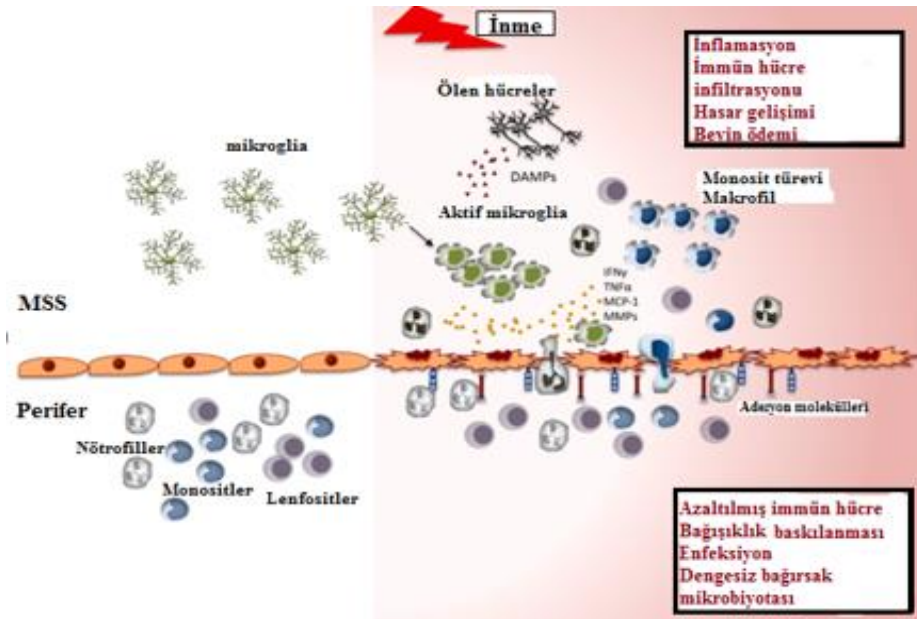
İskeminin akut fazında lezyonun çekirdek kısmındaki mikroglia, TLR reseptörleri (özellikle TLR tip 2 ve TLR tip 4) aracılığıyla DAMPs ve HMGB1'e bağlanmaktadır. Bu bağlanma nucleer factor- κ B (NF- κ B) sinyal yolunu üzerinden mikroglia aktivasyonuna yol açmaktadır (21, 89, 90). DAMPs ile aktive olan mikroglia fagositik fenotip (CD11b, CD45, CD68) ve inflamatuvar yanıtı başlatan kemokinler ve sitokinleri (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18 gibi) salgılayan tip olmak üzere 2 farklı forma dönüşmektedir (4, 5, 69, 90). İnflamatuvar sitokinler özellikle IL-1 β , IL6 ve TNF- α dokuda hasara neden olan inflamatuvar yanıtı artırırken, anti-inflamatuvar özellikte olan IL-10 bu sitokinleri inhibe ederek dokuyu koruyucu etki gösterir (69). IL-10, nötrofil infiltrasyonunu engellemektedir (5). Mikroglial aktivasyonu ile oluşan bu sitokinler, astrositler ve endotel hücrelerinin de aktivasyonunu sağlamaktadır (90). Sitokinlerin salınımı ve bu hücrelerin aktivasyonu lökositlerin agregasyonunda ve hücre adezyon moleküllerinin salınımında önemli rol oynayarak lökosit hücreleri ile endotel hücrelerinin etkileşimini kolaylaştırmaktadır (90).

Nötrofiller iskemik dokuya kandan geçen ilk hücrelerdir. Nötrofiller içeriğindeki zengin sitokinler/kemokinler, matris metalloproteinaz (MMP-9) dahil proteazları salgılayarak lökosit agregasyonunu artırır (90). İskemi sonrası santral sinir sistemi ve periferik immün sistem arasındaki etkileşim şekil 2.9'da şematik olarak gösterilmiştir.

Astrositler kan beyin bariyerinin (KBB) yapısında bulunurlar. Beyin kapiller endotel hücreleri ve perisitlerle çok yakından ilişki içinde olan hücrelerdir. İskemi sırasında MMP-9 bazal lamina yapısını bozarak astrositler ile endotel hücreleri arasındaki bütünlüğü bozmaktadır. Bu etkileşim KBB'de hasara neden olmaktadır (4, 5, 90). KBB'deki bu yapısal hasarın yanı sıra astrositlerin proliferasyonu daha sonraki aşamalarda reaktif gliosis ve skar formasyonuna yol açacak olan monosit kemotaktik

protein-1, IL-1 β , glial fibriler asidik protein (GFAP), vimentin, netsin gibi inflammatuar faktörlerin sentezlenmesi ile sonuçlanmaktadır (90).

Aktive olan nötrofiller daha fazla ROS salınımına da yol açar. Başlangıçta aktive olan mikroglia ardından aktive nötrofillerden sitokinler ve kontrolsüz ROS salınımı iskemik penumbra da lökosit-endotelyal etkileşimine yol açan ve aktive olmuş endotel hücrelerinden salınan platelet (P) ve endotelyal (E) selektinler, vasküler hücre adhezyon molekülleri (VCAM), intrasellüler hücre adhezyon molekülleri (ICAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin düzensiz salınımına yol açar. Bu moleküller lökosit migrasyonu ve doku içine lökosit infiltrasyonunu kolaylaştıran platelet endotelyal hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1)'in salınımına neden olur (4, 5, 89, 90). Adhezyon moleküllerinin yardımıyla kan beyin bariyerini geçen aktive olmuş lökositler diğer inflammatuar hücreler gibi proinflammatuar mediatörler salgırlar. Bu durum inflamasyonun artmasına ve sekonder olarak penumbra da yaygın hücre ölümüne yol açar (69). Ayrıca ROS ile temas eden ve reaktif olan astrositler, kemokinler, sitokinler ve iNOS salgılayarak inflamasyonu artırır (Şekil 2.8) (90). Yapısal olarak hasarlanan ve permabilitesi artan KBB, periferdeki lökositlerin (nötrofil, makrofaj ve lenfositler dahil) endotelden geçerek beyin dokusu içine girişine olanak tanıdığı gibi tersine hem KBB'den hemde BOS yoluyla DAMPs ve sitokinlerin sistemik dolaşıma geçerek sistemik inflammatuar yanıtın da tetiklenmesinde rol oynar (90).



Şekil 2.9. İskemi sonrası santral sinir sistemi ve periferik immün sistem arasındaki etkileşim (5).

2.1.8.6. Kan Beyin Bariyerinin (KBB) Bozulması

Serebral iskemide KBB’de yapısal ve fonksiyonel bozukluklar olmaktadır. KBB’deki bu bozukluklar iske mi sonrası gelişen inflamatuvar yanıt ile çok yakından ilişkilidir. Kan beyin bariyerinin yapısı şekil 2.10’da gösterilmiştir.

İske mi sonrası hiperakut dönemde (ilk 6 saat içinde) ani hipoksi, endotel hücrelerinde iyon transportundaki dengesizliklere bağlı osmotik değişikliklerle sitotoksik ödeme ve KBB’de permabilite artışına yol açmaktadır. Endotelyal hücrelerdeki bu sitotoksik ödem aynı zamanda serebral vazoregülasyonun da bozulmasına yol açmaktadır (91). Hipoksiyle beraber glutamat/kalsiyum toksitesi sonucu gelişen mitokondriyal disfonksiyon süperoksit anyonu ve diğer ROS üretimini artırmaktadır. Erken dönemde mikrodamarlardaki KBB’deki hasarda süperoksit anyonunun yanı sıra aquaporinler, MMP, inflamatuvar hücreler, bradikinin, vasküler endotelyal growth faktör ve NOS rol oynamaktadır. KBB’de artan hasar, vasküler yapıdaki protein gibi makromoleküllerin ve sıvının beyin dokusuna geçmesine yani vazojenik ödeme neden olur (91). Akut dönemde (6-96 saat arası) nöroinflamatuvar süreç erken dönemde görülen bu sitotoksik etkilerin artarak KBB’de permabilitenin daha belirgin hale gelmesine yol açar (91). İske mi sonrası hiperakut dönemde başlayan inflamatuvar yanıt KBB’deki endotel hücreleriyle perisitler arasındaki yapısal bütünlüğü bozarak KBB’de permabilite artışına yol açmaktadır. KBB’deki bu yapısal bozukluk dolaşımdaki nötrofil, makrofaj ve lenfositler gibi immün hücrelerin beyin dokusuna infiltrasyonuna neden olmaktadır (92).

İskemik dokuya ilk giren immün hücre nötrofillerdir. Nötrofiller ROS, elastazlar, proteazlar (MMP-9 dahil) üretiminin yanı sıra pıhtılaşmayı artıran faktörler, tromboz ve KBB hasarında temel rol oynayan pro-inflamatuvar sitokin/kemokinleri salgılar (5, 93). İnflamasyondaki artış proteinazlarla bazal membran ve konponentlerindeki yıkımı artırarak KBB yapısının daha da bozulmasına yol açar. Bu süreçte aktive olan mikroglıadan da IL-1, TNF-alfa, IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler ve NO gibi sitotoksik bileşikler salgılanmaktadır. Bu süreç KBB’deki hasarı ve permabilite artışını daha da belirgin hale getirmektedir. Bu permabilite artışı aynı zamanda hemorajik transformasyon riskini de artırmaktadır. Hemorajik transformasyon reperfüzyon hasarının iyi bir göstergesidir (91).

İske mi sonrası beyin dokusuna geçen nötrofiller inflamatuvar yanıtla ilişkili sitokin/kemotaktik faktörlerin yanı sıra salgıladığı serbest radikaller ve hidrolitik

2.1.8.7. Otofaji

İskemiye bağlı stres durumlarında otofajinin uygun şekilde aktivasyonu hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilecekleri enerjinin hücre içi moleküllerden sentezlenmesi ve hücrel homeostazisin korunması için koruyucu ve yararlı bir mekanizmadır. Ayrıca otofaji, iskemin erken döneminde hasar gören hücre organellerinin ve toksik protein agregatlarının atılarak nöronların ölümden korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (94). Serebral iskemide otofajinin bozulduğu gösterilmiştir (94). İskemi sonrası otofajinin hiperaktif hale gelmesi veya uzaması nöronal apoptoz ve nekroza yol açmaktadır (94-96).

Otofajinin başlatılmasında Beclin 1 proteini temel rol oynar (69, 97). Otofaji aktive olduğunda mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3-I), mikrotübül ilişkili protein 2 hafif zincir 3 (LC3-II)'ye hidrolize olmaktadır (69, 97). Beclin 1 otofaji üzerinde inhibitör etkili bir proteindir (98). Serebral iskemide otofajinin fazla aktive olduğunun bir göstergesi olan Beclin 1 ve LC3-II düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır (98). Otofaji, hiperaktif hale geldiğinde sayı ve volumü artmış disfonksiyonel lizozomların depolanandığı ve bununla ilişkili olarak nöronlarda sinaptik bozukluklar meydana geldiği gösterilmiştir (95). Otofajinin iskemi sonrası nöropatogenezindeki rolü şekil 2.8'de yer almaktadır.

2.1.8.7. İskemi Sonrası Nöronal Apoptoz

İskemik hasar, nekroz ve apoptoz olmak üzere iki farklı tipte hücre ölümüne yol açar. Nekroz, serebral iskemi sonrası gerekli enerji ve osmotik dengenin sağlanmasındaki ağır yetmezlik sonucu eksitotoksiteye bağlı şişme ve osmotik parçalanma sonucu gelişen iskemik çekirdekte görülen irrevesibl hücre ölümüdür (59, 89). Daha hafif hasarın olduğu penumbra bölgesinde görülen reversibl değişiklikler ise apoptoza yol açabilmektedir. Nekrotik hücre ölümünden farklı olan apoptoz, birçok mekanizmanın devreye girdiği kompleks bir süreçtir (61, 89, 98, 99) Apoptoz sürecinde sistein proteaz ailesi kaspazları, BCL-2 protein ailesi, ısı şoku proteinleri ve p53 proteini gibi genellikle protein yapısında birçok faktör rol oynamaktadır (59, 79, 89).

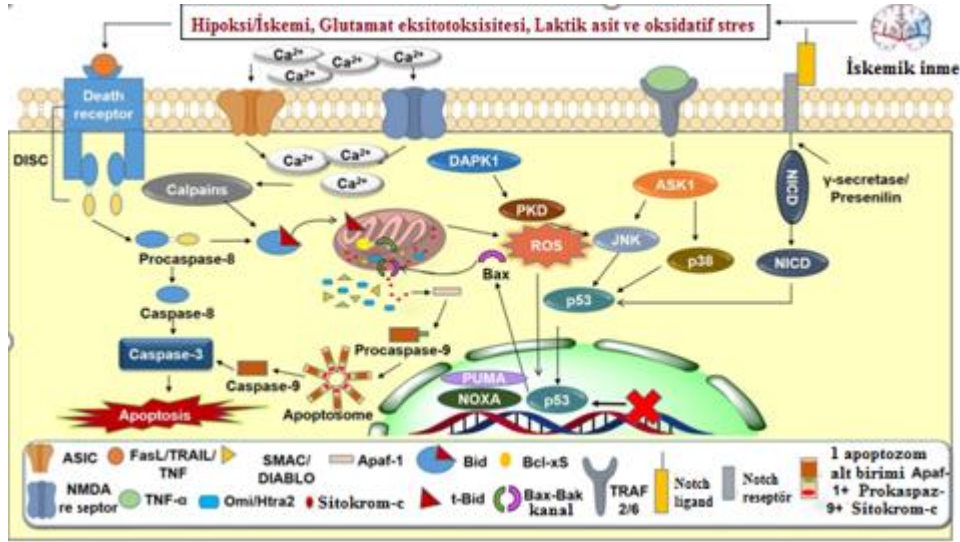
Apoptoz, endojen (intrinsik) veya ekzojen (ekstrinsik) yolla uyarılabilmektedir. Endojen yolak hasarlanmış mitokondri tarafından başlatılmaktadır. Mitokondriyal endojen yolla apoptozun düzenlenmesinde B-hücreli lenfoma/lösemi-2 geni (BCL-2) protein ailesi önemli rol oynamaktadır. BCL-2 ailesi 2 gruba ayrılmaktadır: anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) ve pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad, Noxa, p53-upregülatör). Bu birbirine zıt aktivite gösteren proteinlerin aktivasyonu/inhibisyonu mitokondrinin fonksiyonu ve ROS konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir (20, 99). BCL-2 protein ailesi apoptozun başlaması için kritik önemi olan mitokondri dışı membran geçirgenliğinin düzenlenmesinden sorumludur (99-101). Bu pro-apoptotik proteinler, mitokondriyal permabilitede değişikliklere neden olarak sitokrom c üzerinden kaspaz enzim aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu yolda kaspaz 9 ardından diğer kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) aktive olarak apoptoza neden olmaktadır (98). Pro-apoptotik proteinlerden olan Bax mitokondri dışı membran geçirgenliğinin

düzenlenmesinde direkt olarak rol oynamaktadır (102, 103). İskemiye bağlı mitokondri membranına translokasyon gösteren Bax proteini sitokrom-c salınımına neden olmaktadır (102, 103)

İskemi sonrası görülen hücre içi kalsiyum artışı mitokondriyal disfonksiyona, mitokondriyal disfonksiyon da ROS ve NO üretimine yol açar (99). Nispeten uzun ömürlü ROS'lar (hidrojen peroksit ve süperoksit gibi) organeller ve hücreler arasında diffüze olmaktadır (99). İskemi sonrası mitokondride artmış ROS üretimi ve onunla ilişkili oksidatif stres direkt olarak hücrelerdeki DNA, lipid, protein yapılarında hasar oluşturma yanısıra hücreyi apoptoza götüren BCL-2 yolu üzerinden mitokondriyal elektron transport zinciri ve hücrel redoks dengesinde değişikliklerle mitokondriyal membran potansiyel kaybına yol açmaktadır (20, 99). Bunu mitokondri kaynaklı sitokrom c ve apoptozu indükleyen faktör (AIF), Smac/DIABLO, endonükleaz G, yüksek sıcaklık gereksinim proteini A (HtrA2/OMI) gibi mitokondriyal pro-apoptotik proteinlerin salınımı ile yapmaktadır (20, 99).

Ekzojen yolla apoptoz, hücre yüzeyinde bulunan Fas (CD95/APO1), tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (TNFR1) gibi ölümle ilgili reseptörlere TNF- α , TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve Fas ligand (FasL) gibi aktive edici faktörlerin bağlanmasıyla tetiklenmektedir (61, 98). Sistein proteazlar grubundan olan kaspazlar (kaspaz; sistein-bağımlı aspartat spesifik proteaz) hücrede inaktif formlar (pro-kaspaz) halinde bulunan apoptozun tetiklenmesiyle aktif forma dönüşen enzimlerdir (98, 104). Bu enzim ailesinden kaspaz-1, -2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 apoptoz sırasında aktive olan enzimlerdir (105). Endojen apoptoz yolağının aktive edilmesinde ilk olarak kaspaz-9, ekzojen apoptoz yolağında ise kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktive olmaktadır (105).

İskemi sonrası apoptozda özellikle kaspaz 1 ve 3 önemli rol oynar. Kaspaz bağımlı apoptoz yolağı mitokondriden sitokrom c'nin salınmasıyla başlatılır (20, 99). İskemi sonrası mitokondriyal permabilitenin artışıyla gelişen kollapsa bağlı salınan sitokrom c, sitozolik apoptotik proteaz aktive eden faktör-1 (Apaf1) ile etkileşerek inaktif prokaspaz-9'u aktive eder. Aktif hale gelen kaspaz-9'da kaspaz-3'ü aktive etmektedir (20). Serebral iskemi sonrası bu endojen ve ekzojen yollar dışında bir tümör supresör geni olan p53 proteini aracılığıyla apoptoz diğer bir mekanizmadır. p53 proteini spesifik olarak BCL-2 ailesi üyesi pro-apoptotik özellikte olan Bax ve Noxa proteinlerini uyarmaktadır (98). İskemi sonrası farklı mekanizmalarla ilişkili apoptoz şematik olarak şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. İskemi sonrası apoptoz mekanizmaları (98).

2.1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Tanım

İskemik hasardan kurtarmak için her ne kadar beyine yeniden kan akımı ve doku reperfüzyonunun sağlanması kaçınılmaz temel tedavi hedefi olsa da; belli bir süre iskemide kalmış beyin dokusunda reperfüzyonun kendisi ve reperfüzyon sonrası hızla artan oksijen düzeyleri oksijen paradoksu adı verilen bir dizi reaksiyonla beyin dokusuna fonksiyonel, mikroskopik ve bazen makroskopik hasar vermektedir (4). Bu hasar, iskemiye bağlı oluşan hasara eklenir ve iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı olarak adlandırılır (55, 106).

İskemi sonrası reperfüzyon, spontan gelişir yada rekanlizasyon tedavileriyle sağlanır. Reperfüzyon hasarı akut dönemde uygulanan intravenöz (İV) trombolitik tedavi ve mekanik trombektomi gibi endovasküler girişimlere bağlı olabildiği gibi subakut dönemde uygulanan karotis endarterektomi ve stentleme işleminden sonra da olabilmektedir (4). Reperfüzyona bağlı gelişen hasarda en kritik durum, hali hazırda iskemiye maruz kalmış, oksidatif stres altında ve ROS üreten beyin dokusunda tıkalı arterin açılmasıyla dokuda oksijen düzeylerinin artması sonucu ROS ve RNS üretiminin daha da artmasıdır (55). Bu kontrolsüz ROS üretimi direkt olarak nörondaki hasarı arttırdığı gibi iskemiyle birlikte tetiklenmiş nöroinflamatuvar yanıtın daha da artmasına ve KBB’indeki hasarın daha da ağırlaşmasına yol açmaktadır (4, 55).

Epidemiyoloji

Akut iskemik inmede İV trombolitik tedavi ve mekanik trombektomi sonrası gelişen I/R hasarını dünya genelinde değerlendiren veriler olmadığından epidemiyolojik olarak sıklığı net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte erken dönem görülen hemorajik transformasyonun reperfüzyon hasarının bir göstergesi olduğu kabul edilirse semptomatik hemorajik transformasyonun İV trombolitik tedavi sonrası %7.3 ve mekanik trombektomi sonrası %4.4-7 oranında görüldüğü bildirilmektedir (4).

Patofizyoloji

İskemi/reperfüzyon hasarına yol açan mekanizmalar net olarak bilinmemektedir ve patofizyolojik değişikliklerin multifaktöriyel olduğu kabul edilmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde hücresel ve moleküler düzeyde şu mekanizmalar rol oynamaktadır (55, 91, 93, 107):

- Artan ROS ve RNS ile ilişkili oksidatif/nitratif stres,
- Lökosit infiltrasyonu ile artan inflamatuvar yanıt,
- Trombosit adezyon/agregasyonu ve onunla ilişkili mikrovasküler hasar,
- Kompleman sisteminin aktivasyonu,
- Mitokondriyal hasarla ilişkili mekanizmalar (serbest radikal oluşumu, apoptoz, nekroz)
- Kan beyin bariyeri hasarında artma

a) İskemi/Reperfüzyon Sonrası Oksidatif ve Nitratif Stres

İskemiyi izleyen reperfüzyon sırasında fazla miktarda oksijene maruz kalan dokuda ROS ve RNS üretimi artar. İskemi/reperfüzyon hasarında artan oksidatif stres beyin dokusunda önemli miktarda bulunan ve süperoksit radikalının oluşumunda rol oynayan NADPH oksidaz ayrıca ksantin oksidaz ve eNOS aktivitelerini artırmaktadır (79). İskemi sonrası dokulardaki ROS'un majör kaynağı reperfüzyon sonrası moleküler oksijeni kullanarak iskemik dokuda oluşan hipoksantini ksantine çeviren ksantin oksidaz enzimidir. Buna ilaveten, ROS mitokondrilerde de üretilmektedir (4). Reperfüzyon sonrası artan ROS hücrenin protein, DNA, RNA, lipid yapısındaki tüm konponentlerini direkt olarak etkilemekte ve nöronal hasara neden olmaktadır (55). Ayrıca bu kontrolsüz ROS üretimi, iske miyle tetiklenmiş olan pro-inflamatuvar kaskadın aktivasyonunu daha da arttırarak çok daha fazla sayıda lökositin dokuda birikmesi ve aktivasyonuna yol açar (4, 98). Reperfüzyona bağlı hücre içi artan ROS ve onunla ilişkili artmış oksidatif stres

mitokondriyal membrandaki kalsiyum pompaları aracılığıyla kalsiyumun hücre içi artışına ve mitokondrilerde yapısal hasara neden olmaktadır. Artmış mitokondriyal hasar, hücre ölümüne yol açan otofaji ve mitofajinin hiperaktivasyonu ve apoptozla ilişkili kaskadın uyarılmasına yol açmaktadır (55, 67, 99).

Serebral I/R sırasında RNS ile ilişkili nitratif strese tetiklenmektedir. Reperfüzyon sonrası süperoksit sentezinde artış olduğu gibi NO sentezi ve dolayısıyla peroksinitrit sentezi de artmaktadır (83). Nitratif stres, başlıca peroksinitrit ile indüklenir (69). Peroksinitrit, normal endotel fonksiyonunu bozarak artmış karbondioksit yanıt olarak oluşan vazodilatasyonun kaybına tersine vazokonstriksiyon oluşumuna neden olur. Ayrıca trombosit agregasyonunu arttırmaktadır (61). Peroksinitrit, proteinlerin denatürasyonuna, lipid peroksidasyonuna, DNA’da hasara yol açarak mitokondrilerin ve hücrenin iskelet yapısını bozmaktadır (84).

b) İskemi/Reperfüzyon Sonrası İnflamatuar Yanıt

İskemi sonrası penumbra p-selektin, ICAM-1 gibi adhezyon moleküllerinin salınımı sonucu lökosit-endotel hücrelerin etkileşimi artmış durumdadır. I/R’de süperoksit anyonu endotel p-selektin salınımını arttırmaktadır (55). Kontrolsüz ROS üretimi, p-selektin, ICAM-1 ve PECAM-1 aracılı lökosit agregasyon ve adhezyonunu daha da arttırarak iskemik dokuya lökosit infiltrasyonunu arttırmaktadır. Kontrolsüz ROS aynı zamanda I/R hasarı sonrası aktive olmuş mikroglia hiperaktif hale gelmektedir. Bu inflammatuar yanıtın daha da artmasına yola açmaktadır (79).

Oksidatif stres, C3a ve güçlü anaflaktik etkili C5a gibi kompleman sistem konponentlerinin aktivasyonuna da yol açmaktadır. C5a komplemanı, nötrofiller için güçlü kemoreaktandır. C5a komplemanı, nötrofillerden TNF- α , IL-1, IL-6 gibi proinflammatuar sitokinlerin salınımıyla lökosit adhezyon moleküllerinin ve sonuç olarak lökosit agregasyonun artmasına yol açmaktadır. C5b-9, diğer aktive olmuş konponentlerle birlikte daha fazla lökosit aktivasyonu ve hücre membranında geçirgenliği artırarak membran fosfoliplerinde hasarla lizise yol açan membran atak kompleksinin (MAC) aktivasyonuna yol açmaktadır . Buna ilaveten MAC reperfüze dokuda lökosit birikiminde temel rol oynayan IL-8’in lokal salınımında ve yine inflamasyonda önemli rol oynayan monosit kemoreaktan protein 1’in (MCP-1 veya CCL2) endotel yüzeyinden salınımında rol oynamaktadır (4, 55).

Reperfüzyon, trombosit aktivasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreçte artan p-selektin aktive olmuş nötrofil ve trombositlerin adhezyonunda temel rol oynar. Aktive trombositler ROS, trombaksan A2, araşdonik asit metabolitleri, platelet faktör-4 ve serotonin gibi pro-inflamatuvar faktörler salgırlar (55, 107). Trombositlerin bu aktivasyonu mikrovasküler yapılar da pıhtı birikimine yol açarak reperfüzyon sonrası akım yokluğu olarak adlandırılan “no-reflow” fenomenine yol açmaktadır (4). Buna ek olarak, iskemik hasardan sonra perisitlerin kontrakte halde kaldığı ve damar tam açılmış olsa dahi perisitlerin kasılı halde kaldığı bunun rekanlizasyon tedavilerden sonra görülen bu no-reflow etkiden sorumlu olabileceği de ileri sürülmektedir (91).

c) İskemi/Reperfüzyon Sonrası Kan Beyin Bariyeri Hasarı

Artmış ROS’a bağı lipid peroksidasyonu, lökosit-endotelial adhezyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, nötrofillerin infiltrasyonu ve aktive trombositlerin agregasyonuna bağı KBB yapısal olarak hasar görmektedir (4, 55, 108). Hasar gören KBB’den nötrofiller ve toksinlerinin dokuya girişı daha da artmaktadır. Reperfüzyon, kapiller bazal membran hasarı ve kapiller permabilite artışına yol açan MMP gibi proteazların aktivasyonuna da neden olmaktadır (4, 55). İskemi/reperfüzyon sonrası KBB’de görülen değişikliklerin 3 aşaması vardır (55). Reperfüzyonla yeniden sağlanan kan akımı iskemi sonrası yapısı bozulan KBB’den dokuya su ve makromoleküllerün geçişine de olanak sağlamaktadır. Erken dönemde gelişen bu reaktif hiperemi ilk aşamada sitotoksik ödeme, gelişen sitotoksik ödem de KBB’de permabilite artışına ve serebral vazoregülasyonun kaybına yol açmaktadır (55, 91). Bunu endotel-astrosit etkileşiminin bozulması ve inflamasyonun aktive olmasıyla ortaya çıkan reaktif mikrovasküler obstrüksiyonla ilişkili hipoperfüzyon aşaması izlemektedir. Bu aşama beyin dokusun beslenmesinin bozulması ve inflamatuvar yanıtı daha da artıran nötrofil infiltrasyonunun artmasına yol açar (55). Reperfüzyonu izleyen bu hipoperfüzyon sonrası üçüncü aşamada MMP aracılı parasellüler permabilite artışı olmaktadır (55, 91).

Reperfüzyonun indüklediği ROS üretimi ve inflamasyon nötrofillerin kandan dokuya geçişini daha da artırır. Nötrofillerden reperfüzyonun başlangıcından 3-8 saat içinde MMP-2 ve 18-96 saat sonra MMP-3 ve MMP-9 salınır. Bundan sonraki aşama vazojenik ödem ve anjiogenezis ile ilişkilidir. Reperfüzyon sonrası KBB hasara bağı olarak hemorajik transformasyon gelişebilmektedir (55, 91).

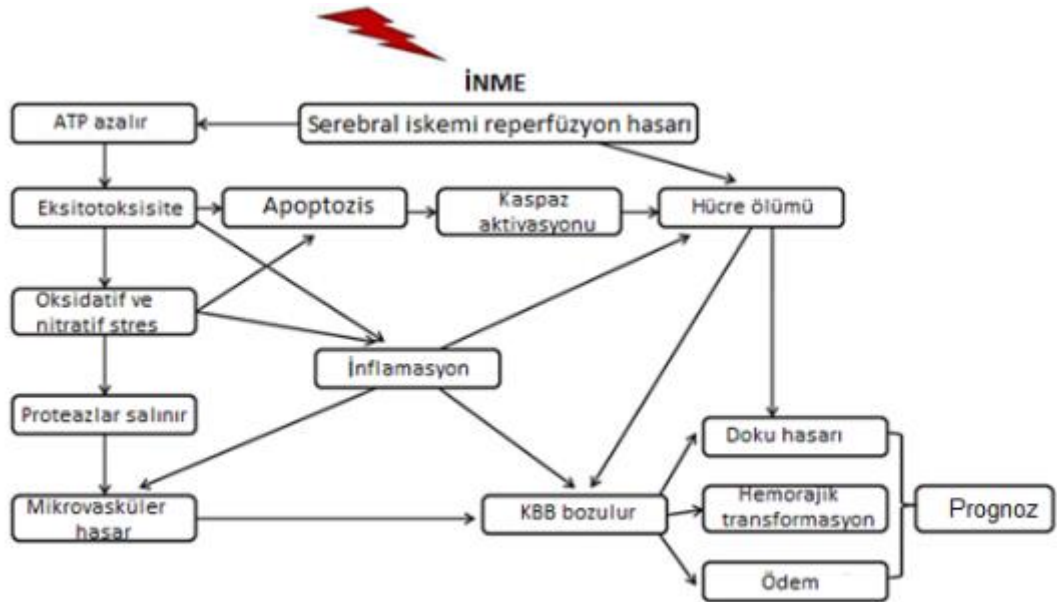
Erken dönem (<36 saat) görülen hemorajik transformasyonda nötrofil kaynaklı MMP-2, KBB'deki başlangıç fazında gelişen (ilk 3 saat) permabilite ile ilişkilidir. Bunun tersine geç KBB bozulması ve hemorajik transformasyon (>36 saat) nöroinflamasyona bağlı beyin kaynaklı proteazlar (MMP-9 gibi) ve vasküler yeniden yapılanmayı sağlayan (VEGF; vasküler endotelial growth faktör gibi) faktörlerle ilişkili bulunmuştur (91, 93). MMP-2 ve MMP-9 bu etkilerini KBB'de bulunan ve yapısal bütünlüğü sağlayan bağlantı proteinlerini (zonula okludens-1, okludin, klaudin-5 gibi) yıkarak göstermektedir (89). Bunlara ek olarak I/R'da ROS ve mitokondrial sitokrom c salınımı, kaspaz-3 aracılı KBB yıkımına neden olmaktadır (93). KBB'deki yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açan I/R sonrası gelişen bu kaskad beyin ödemi ve intrakraniyal basınç artışına neden olmaktadır (79, 98).

İV trombolitik tedavi ile ilişkili hemorajik transformasyon, reperfüzyon sonrası gelişen patofizyolojik süreçle ilişkili olmasının yanı sıra kullanılan rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rt-PA)'nın bir yan etkisi olarak ta ortaya çıkmaktadır. Trombolitik tedavide kullanılan rt-PA, hemorajik transformasyon riskini 10 kat arttırmaktadır (93). rt-PA, iskemi sonrası perisitler tarafından sentezlenmiş bulunan MMP'lerin aktivitesini arttırmaktadır (91). Trombin veya rt-PA bu etkisini proteaz ile aktive olan reseptör 1 (PAR 1) aktivasyonu ile ve NF-κB yolağı üzerinde MMP-9 salınımını arttırarak göstermektedir. İskemi sonrası perisitler tarafından zaten sentezlenmiş bulunan ve bu aktivasyonla sentezi daha da artan MMP-9, ekstrasellüler matriksin proteolizini ve KBB'nin yapısal proteinlerinden biri olan konneksin-43'ün fosforilasyonuna yol açarak KBB permabilitesini arttırmaktadır (şekil 2.10) (89, 91, 93).

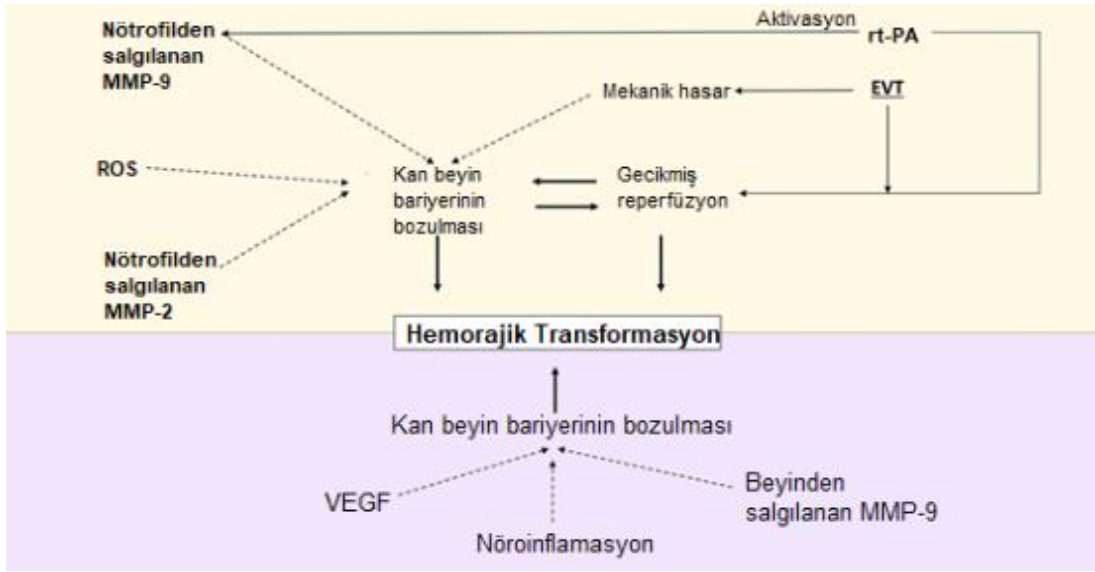
Endovasküler tedavi, pıhtı çıkarılırken mekanik olarak direk endotel üzerine travma etkisiyle potansiyel hasar verici özellikte bir tedavidir. Mekanik trombektomide kullanılan aletler endotel yüzeyinde hasara, laminada harabiyete, intimal ve medial tabakalarda ödeme yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra, işlem sonrası tıkalı damarın açılması dokuda hızlı ve ani reperfüzyon nedenidir. Yararlılığı gösterilmiş olmasına rağmen bu nedenle endovasküler tedavi erken dönemde I/R hasarı ve onunla ilişkili hemorajik transformasyonun bir nedeni olabilmektedir (91). İskemi reperfüzyon hasarında patofizyolojik mekanizmalar şekil 2.12'de ve iskemi sonrası erken ve geç hemorajik transformasyonda kan beyin bariyerinin rolü şematik olarak şekil 2.13'te gösterilmiştir.

d) İskemi/Reperfüzyon Sonrası Hücre Ölümü

İskemiye izleyerek gelişen ve I/R sonrası daha da artan oksidatif stres ve nöroinflamasyonla ilişkili olarak apoptoz (kaspaz 3, 8, 9 ve Bax/Bcl2 üzerinden), otofaji (LC3II/I ve Beclin 1 aracılı) ve pyroptoz (NLRP3, kaspaz 1, ASC, IL-1 β aracılı) yoluyla hücre ölümü görülmektedir. Bu mekanizmalardan başka reperfüzyonu izleyen ilk birkaç saat içinde yani kaspaz aracılı apoptozdan daha erken başlayan ve muhtemelen bu yolun da ayrıca aktive olmasında öncülük yapan nekroptoz (programlanmış nekroz) olarak adlandırılan hücre ölüm şekli görülmektedir. Nekroptoz, nekrozla apoptozun kesiştiği kaspaz bağımsız bir hücre ölüm yoludur (98). Artmış glutamat, asidoz, TNF-alfa ayrıca TLR ve fas ligand reseptörleri nekroptozla ilişkili hücre ölümünde temel rol oynamaktadır (79, 98).



Şekil 2.12. İskemi reperfüzyon hasarında patofizyolojik mekanizmalar (61).



Şekil 2.13. İskemi sonrası erken ve geç hemorajik transformasyonda kan beyin bariyerinin rolü (91). (EVT; endovasküler tedavi, rt-PA; rekombinant doku plazminojen aktivatörü)

2.1.10. Akut İskemik İnmede Güncel Tedaviler

İskemik inmede akut dönemde bozulan perfüzyonun en kısa sürede tekrar sağlanması tedavinin temel stratejisidir. İnfarkt dokusundaki iskemik çekirdeğin kurtarılma şansı yoktur ama penumbra'ya yeniden yeterli düzeyde kan akımı sağlanabilir ve metabolizma normale döndürülebilirse bu dokudaki kalıcı hasarın azaltılması/önlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu amaçla, akut iskemik inmenin ilk 4.5 saati içinde kriterleri karşılayan hastalara uygulanan İV trombolitik tedavi ve seçilmiş olgularda 24 saate kadar uygulanabilen mekanik trombektomi rekanalizasyonu hedefleyen, etkinlikleri gösterilmiş güncel tedavilerdir (2, 57).

a) Trombolitik Tedavi

Akut iskemik inmede mihenk taşı sayılabilecek tedavilerden biri olan İV trombolitik tedavinin etkinliği (erken veya geç dönem) kesin olarak kanıtlanmıştır. Trombolitik tedavide rt-PA kullanılmaktadır. İV rt-PA olarak Alteplaz 1990 yılından beri inme tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi ilk olarak 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde onay alarak kullanılmaya başlanmıştır (2). Bu tedavi tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın kullanılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlarıyla akut inme tedavisinde yeni bir dönem başlatmıştır.

b) Endovasküler Tedaviler

Gösterilmiş etkinliğine karşın İV trombolitik tedavinin kısa bir zaman aralığında uygulanabiliyor olması, sistemik/intrakraniyal hemoraji riski, büyük trombüs yükü ile ilişkili proksimal arter oklüzyonu olan hastalarda düşük yanıt oranı nedeniyle daha etkili alternatif tedavi arayışlarına yol açmıştır.

Yeni nesil trombektomi ve tromboaspirasyon cihazlarının kullanıldığı çalışmaların olumlu sonuçlanmasıyla, proksimal arter oklüzyonu varlığında pıhtıya doğrudan ulaşım ve farmakolojik/mekanik yollar ile direkt müdahale imkanı sağlayan endovasküler tedaviler rekanalizasyon için yeni tedavi seçeneği olmuştur (109).

Güvenli ve etkin tedavi seçeneği olarak akut inmede mekanik trombektomi, ilk olarak 2015 yılında semptomların başlangıcının ilk 6 saatinde olan hastalar için onaylandı. 2018 yılında güncellenen Amerikan kalp derneği/Amerikan inme derneği (AHA/ASA) tedavi rehberinde önerilen kriterleri karşılayan ve seçilmiş hastalarda 24 saate kadar sınıf I, kanıt A düzeyinde bir tavsiye kararı ile kullanılması önerilmektedir (3).

2.2. Cinnamon Bark Oil

2.2.1. Genel Bilgiler

Cinnamomum, *Lauraceae* (Defnegiller) familyasında yer alan ağaçtan elde edilen ve halk arasında tarçın olarak bilinen baharatın bilimsel adıdır. Cinnamomum, Yunan dilinde baharat ve tatlı odun anlamına gelen “kinnamoomon” sözcüğünden köken almış daha sonra Latinceye “cinnamomum” olarak geçmiştir (110). Türkçede, Hindistan’da kullanılan ve Çin odunu anlamına gelen ‘dal chini’ sözcüğünden köken alarak zaman içinde tarçın şeklini almıştır.

M.Ö. 3000 yıllarında Çinliler tarafından ilaç olarak kullanılmış olup insanlık tarihinin bilinen en eski baharatlarından biridir. Eski Mısır’da ve Roma İmparatorluğunda ölümlerin mumyalanmasında, Avrupada dinsel ayinlerde, bir baharat olarak gıdaların tad ve aromasının artırılmasında, gıdaların korunmasında, ağacın meyvesinden elde edilen tarçın esansı parfüm endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra tarih boyunca tıbbın pek çok alanında tedavi amaçlı kullanım alanı olmuştur (9, 111).

Tarçının anavatanı Hindistanın güneydoğusunda yer alan, eski adı Seylan (Ceylon) olarak bilinen yeni adıyla Sri Lanka adası olduğu kabul edilir. Coğrafi olarak

Asyadan Avustralyaya uzanan bölgede ağaç ve çalı şeklinde 250'den fazla bilinen türü bulunmaktadır (9, 112). Tarçın ağacı, tropikal iklimin hakim olduğu bölgelerde bulunan yağmur ormanlarında, balçıklı ve özellikle humusça zengin kumlu toprakta iyi yetişir (9, 111). Bu nedenle ülkemizin içinde bulunduğu coğrafi kuşağın iklimi tarçın ağacının yetişmesi için uygun değildir.

Seylan tarçını (*Cinnamomum verum* J. Presl sinonimi *Cinnamomum zeylanicum* veya hakiki tarçın) ve Çin tarçını (*Cinnamomum cassia*) defnegiller familyasının en önemli iki türüdür (8). *Cinnamomum verum* (*C.verum*) yapraklarını dökmeyen boyutları 10-15 metreye kadar uzayan bir ağaç türüdür. Tarçın ağacının yaprakları koyu yeşil renkte ve 7-18 santimetre uzunluğundadır. Çiçekleri salkım şeklinde yeşile yakın veya sarımsı-beyaz renktedir. Meyvesi tek tohum içeren bir santim uzunluğunda tane şeklindedir (9). Şekil 2.16'da *C.verum* tarçının kabuk, yaprak ve meyvesi gösterilmiştir. Tarçın baharatı ağacın gövde ve dal kabuklarının dış kısmı sıyrıldıktan sonra kalan iç kabuğu kurutulmasıyla elde edilir. Baharat olarak tatlımsı tadı hoş olan bu tarçın türü hakiki/gerçek tarçın olarak kabul görmektedir (9). *C.verum* asıl olarak tropikal Güney Hindistan ve Sri Lanka'da, deniz seviyesinden 900 metre yükseklikte doğal bir yayılış göstermekle birlikte güneydoğu asya, Çin, Burma, Endonezya, Karayip adaları, Madagaskar, Avustralya ve Afrikaya kadar yayılmıştır (9, 113).

Çin tarçını Seylan tarçınına göre daha yakıcı ve keskin kokulu olduğundan daha az değerlidir (113). Çin, Vietnam, Bangladeş, Uganda ve Endonezya'da yetişir (12). Ayrıca *C.cassia* tarçının yüksek düzeyde kumarin (%0.8-10) içermesi nedeniyle hepatotoksik olabileceği, bu nedenle içeriğinde kumarini sadece %0-0.2 olan *C.verum* tarçının kullanılmasının daha güvenli olabileceği bildirilmiştir (114, 115).

Tarçın, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımı güvenli madde olarak kabul edilmiştir. Oral yolla, 6 gr/gün dozunda 6 hafta süre ile kullanımın insanların çoğunda güvenli olabileceği bildirilmiştir. Avrupa Besin Güvenliği Otoritesi ise her gün 1 çay kaşığı veya 0.1 mg/kg hesabıyla tüketilmesini günlük tolere edilebilir miktar olarak önermektedir (115).



Şekil 2.14. *Cinnamomum verum* tarçının kabuk, yaprak ve meyvesi (9).

2.2.2. Cinnamon bark oil'in (CBO) kimyasal yapısı ve özellikleri

Tarçın (*C. verum*) içerik olarak kabuk, yaprak, çiçek ve meyve kısmında çok sayıda reçine özelliğindeki bileşiklerden ve esansiyel yağlardan oluşmaktadır. Tarçında 11 ayrı kimyasal sınıfa ait bileşik bulunmaktadır. Bunlar; aldehitler, alkoller, esterler, fenoller, asitler, monoterpenler, diterpenler, seskuiterpenler, benzopyronlar, hidrokarbonlar ve flavonoidlerdir (9). Bu kimyasal sınıflarda yer alan 61 adet bileşik tablo 2.2’de özetlenmiştir. Tarçında tanımlanan spesifik antioksidan fitokimyasallar arasında epikateşin, kamfen, öjenol, gama-terpinen, fenol, salisilik asit ve tanenler bulunur (116). Ayrıca tarçın kabuk, dal, yaprak, meyve ve çiçek kısımlarında uçucu nitelikte esansiyel yağ içermektedir (114). Çalışmada kullandığımız CBO tarçın kabuğundan elde edilen esansiyel yağdır. CBO kimyasal olarak aldehit, monoterpen, diterpen, seskuiterpen, hidrokarbon, flavonoid ve polifenol sınıfından birçok bileşik içermektedir. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometre (GC-MS; Gas Chromatography-Mass Spectrometry) yöntemiyle CBO’nun içeriğindeki 5 ana bileşiğin sinnamaldehit, öjenol, karyofillen, sinnamil asetat ve α -humulin olduğu gösterilmiştir (9, 117). Bu çalışmada CBO içeriğinde sinnamaldehit en yüksek oranda (%82.5) olmak üzere, öjenol (%17), karyofillen %1.2, sinnamil asetat %0.01 ve α -humulen %0.12 olarak saptanmıştır (117).

Gaz Kromatografisi – flame ionization detektör, GC–MS analiz yöntemi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada CBO’da bu 5 bileşik dahil toplamda 27 bileşik bulunduğu saptanmış ve bunların 24’nün kimyasal yapısı ayırtedilebilmiştir. Bu çalışmada da sinnamaldehitin en yüksek konsantrasyonda (%56) bulunan bileşik olduğu saptanmıştır (118).

CBO'nun yapısında saptanan bileşikler şunlardır:

- Sınnamaldehit
- Öjenol
- β -Karyofillen
- Sınnamil asetat
- α -humulen
- α -Pinen
- β -Pinen
- Kamfen
- 3-Karen
- α –Fellandren
- α -Terpinen
- Limonen
- β –Fellandren
- *p*-Simen
- α -Terpineol
- Benzaldehit
- Linalool
- α -Terpineol
- Hidrosınnamik aldehit
- Hidrosınnamil asetat
- Karyofillen oksit
- Sınnamil alkol
- Metoksiainnmaldehit
- Benzil benzoat

Sınnamaldehit, tarçına tad ve aromasını veren bileşiktir. CBO'in içeriğindeki ana kimyasal bileşendir (119). Anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-mikrobiyal etki gibi pek çok biyolojik aktiviteyle ilişkili bileşen olduğu gösterilmiştir (119, 120). Sınnamaldehit, farmakolojik aktivitesinde belirleyici olan kimyasal olarak fonksiyonel

bir aldehidik grup ($-CHO$) içermektedir. Bu içerik serbest radikallere hidrojen atomu vererek bu yapıların termodinamik kararlılığa erişmelerini sağlamaktadır ve sonuç olarak oksidatif stresi önlemektedir. Buna ek olarak, sinnamaldehit metal şelatörü olarak pek çok sinyal yolunu aktive edebilmektedir (9).

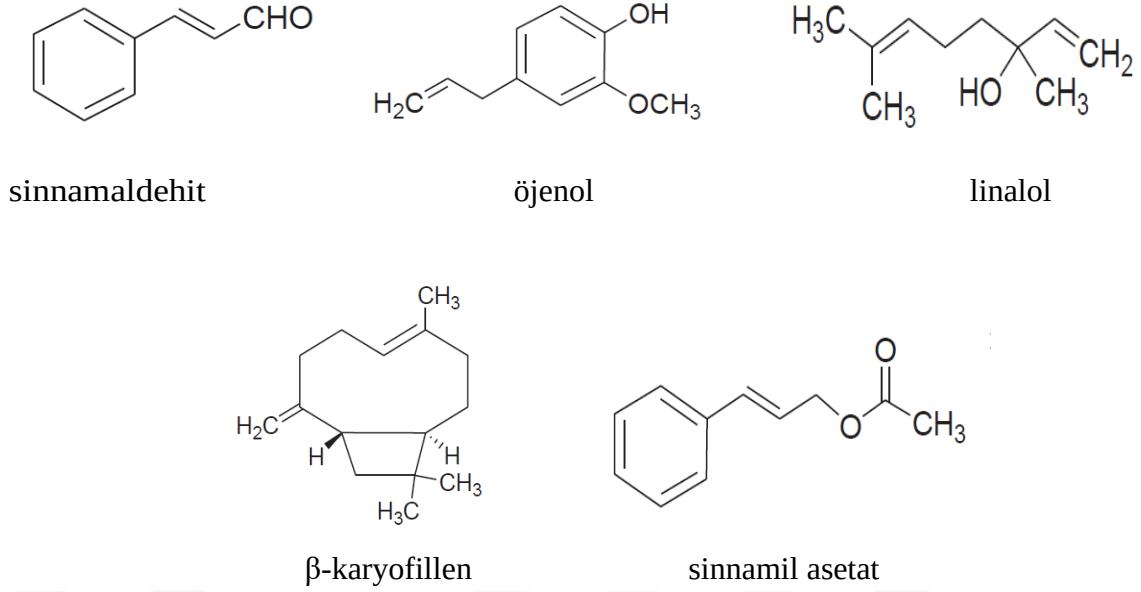
Sinnamaldehyt, kullanılan ekstrakte edilme yöntemine bağlı olarak CBO’da %53 ile %90 oranında bulunabileceği bildirilmektedir (111, 118, 121). Öjenol ise %5 ile %17 oranında bulunmaktadır (117). CBO’da diğer bileşenlerin varlığı ve oranı değişkenlik gösterebilmektedir (121). Cinnamon Bark Oil’in kimyasal yapısında bulunan bazı bileşikler şekil 2.15’te gösterilmiştir. Tarçın yaprağından elde edilen esansiyel yağ ise başlıca öjenol (%70-95) içermekte iken çiçek ve meyvelerden elde edilen esansiyel yağ başlıca sinnamil asetat ve karyofillen bileşiklerini içermektedir (7, 9).

Tablo 2.2. Tarçının (*C.verum*) Kimyasal Bileşenleri (9).

Bileşiğin Sınıfı	Bileşiği Adı-Bileşikteki Oranı (%)
Aldehit	*Sinnamaldehyt (74.5)
	*Metoksiinnamaldehyt (3.9)
	Hidrosinnamik aldehit
	Benzaldehit
	Vanillin
	Kuminaldehyt
	Benzenepropanal
	2-Methyl-3-fenil-propanal
	Sitronellal
Alkol	*Sinnamil alkol (1.8)
	*Linalool (3.7)
	α -Terpineol
	α -Bisabolol
Ester	*Sinnamil asetat (8.8)
	*Sinnamaldehyt dietil asetal (2.4)
	*Metil sinnamat (82)
	Etil sinnamat
	Hidrosinamil asetat
	Öjenil asetat
	*Benzil benzoat (6)
Fenol	Bornil asetat
	*Öjenol (71)
	Pirogallol

Asit	Sinnamik asit
	Ferulik asit
	Kafeik asit
	Gallik asit
	Protokateşik asit
	Oleik asit
	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit
Monoterpen	* <i>p</i> -Simen (1.9)
	* α -Terpinen (1.3)
	*Limonen (1.2)
	* α -Pinen (3.3)
	Kamfen
	Kamfor
	*(1,4)-Sineol (4.6)
	β -Pinen
	* β –Fellandren (2)
	α –Fellandren
	3-Karen
Diterpen	Sinnzeylanin
	Sinnzeylanol
Seskiterpen	Humulen
	Karyofillen oksit
	* β -Karyofillen (8)
	* α –Muurolen (1.8)
	α –Kopaen (3.86)
	Sedren
	α –Tumeron (3.3)
	β –Tumeron
	α -Kadinol
	<i>t</i> -Kadinol
	Kalamenen
Benzopiron	α –Ylangen
	Kumarin
Hidrokarbon	δ -Kadinen
	*Mirsen (2.4)
	Stiren
Flavonoid	*A-tipi prosiyanidin dimer (24)
	B-tipi prosiyanidin dimer

*İçerikte % 1'in üzerinde bulunan bileşikler



Şekil 2.15. Cinnamon Bark Oil'in kimyasal yapısında bulunan bazı bileşikler (9).

2.2.3. Tarçının Geleneksel Kullanımı

Tarçın binlerce yıldır yiyeceklere tat verdiği en iyi bilinen baharatlardan biridir.

Yiyeceklere/içeceklere tat katmak, gıdaların korunması, diş ağrısı, baş ağrısı, bulantı, ateş, öksürük, artrit, ağız enfeksiyonları, ağızdaki kötü kokuların giderilmesi gibi ağız sağlığıyla ilgili durumlarda ve akne tedavisinde kullanılmıştır (122). Ayurvedik literatürde gaz önleyici, anti-emetik, anti-diyaretik, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-paraziter, anti-bronşitik özellikte bir madde olarak geçmektedir (111, 121).

2.2.4. Klinik Farmakolojik Özellikleri

Literatürde C.verumun içeriğindeki çeşitli bileşikler ve CBO ilgili yapılmış çalışmalarda farmakolojik olarak; anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral, anti-paraziter, anti-ülser, anti-lipidemik, anti-kanser, anti-piretik, anti-platelet, anti-allerjik, anti-hipertansif, anti-diabetik ve anestezi etkileri olduğu gösterilmiştir (9, 111, 112, 114, 117, 118, 123-127). Ayrıca gastroprotektif, kardioprotektif, hepatoprotektif, immunomodulator ve nöroprotektif etkilerinin de bulunduğu bildirilmiştir (9, 112, 128). Tarçının başlıca klinik farmakolojik özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

2.2.4.1. Anti-mikrobiyal etkisi

Tarçın bileşikleri ve CBO'nun doğal anti-mikrobiyal etkisi literatürde üzerinde en çok çalışılmış ve iyi tanımlanmış özelliklerinden biridir. Anti-bakteriyel etkisi hem gram pozitif ve hem gram negatif çok sayıda bakteri ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca anti-viral, anti-fungal, anti-paraziter etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (111, 114, 117, 118, 123, 125, 126, 129-132).

CBO'nun hidrofobik özellikte olması bakteri duvarının geçirgenliğini artırmak suretiyle hücre organellerinin hücre dışına çıkması ve ölümüne yol açmaktadır. Bunun dışında hücre içi stoplazmik enzimler üzerinden enerji metabolizmasını yavaşlatarak ve hücrenin temel yapısında yer alan maddelerin (lipid gibi) sentezini bozarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, oksidatif stresi indükleyerek hücre zarının geçirgenliğini artırdığı ayrıca bakteri hücre duvarını antikorlara duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (9, 111). CBO'nun antibiyotiklerle birlikte kullanımı sinerjistik etki göstermekte ve anti-bakteriyel etkinliği artırmaktadır (111).

2.2.4.2. Anti-oksidan Etkisi

Deneyisel diabetik rat modelinde tarçın bileşiklerinin glutatyon peroksidaz, katalaz, SOD gibi enzimlerin düzeylerini artırarak anti-oksidan etki gösterdiği saptanmıştır (133). Tarçının fenol ve flavonoid bileşikleri iyi anti-oksidan etki göstermektedir (9, 134). Tarçındaki aktif bileşikler dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran serbest radikallere bir hidrojen atomu vererek onların stabil hale gelmesini sonuç olarak hücredeki oksidatif stresi azaltarak apoptozdan korunmasını sağlayabilmektedir (134).

CBO'da başlıca bileşik olan sinnamaldehitin bazı kanser türlerinde pro-apoptotik etkilerle antiproliferatif olduğu gösterilmiştir. Bu durumda sinnamaldehit farklı mekanizmalar üzerinden apoptozu indükleyerek hücreyi oksidatif stresten dolayısıyla kanserden koruyucu özellik göstermektedir (135). Sinnamaldehit, mitokondriden sitokrom C salınımını artırarak caspaz-9 ve caspaz-3 enzim aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca Bax geni gibi pro-apoptotik faktörlerinin ekspresyonunu artırırken Bcl-2 apoptotik inhibitörlerin ekspresyonunu azaltarak hücrede apoptozu uyarmaktadır (135). Bir diğer mekanizma olarak sinnamaldehit, hücresel antioksidan savunma sisteminin başlıca düzenleyicisi olan Nrf2 proteinini (nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör) aktive etmektedir. Bu etkisini ubiquitini bloke etmek suretiyle Nrf2 gen ekspresyonuyla Nrf2 proteinin yarılanma ömrünü

artırarak göstermektedir. Bu aktivasyon, antioksidan enzimlerin salınmasına yol açarak hücreyi oksidatif strese korumaktadır (119). Öjenol ve CBO, peroksinitritin indüklediği lipid peroksidasyonunu inhibe etmede güçlü antioksidan aktivite göstermektedir (114, 128).

2.2.4.3. Anti-inflamatuar Etkisi

Tarçın proinflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe etmektedir. Tarçının içeriğinde asit sınıfından bir bileşik olan sinamik asidin IL-6 ve TNF- α düzeylerini anlamlı azalttığı gösterilmiştir (136). Trans-sinamaldehit ve *p*-simen bileşiklerinin güçlü anti-inflamatuar etkili oldukları ve bu etkilerini sinerjistik olarak IL-8 sekresyonunu azaltarak gösterdikleri saptanmıştır. (120). Ayrıca tarçın ve başlıca bileşeni olan sinamaldehit, iNOS, COX-2, TNF- α , Akt, MAPK gibi pro-inflamatuar faktörlerin salınımını ve NF-kB yolağı üzerinden NO sentezini azaltarak anti-inflamatuar etki göstermektedir (120).

2.2.4.4. İnsülin Direnci, Diabetes Mellitus Tip 2 ve Metabolik Sendrom üzerine etkileri

Glisemik kontrol üzerine etkisi ile ilgili literatürde yapılmış çok sayıda çalışmada tarçın ve bileşenlerinin; açlık-tokluk plazma glukoz seviyesini düşürme, insülin duyarlılığını artırma ve HbA1c seviyesini düşürerek insülin direncini azalttığı dolayısıyla pre-diabet ve diabetes mellitus tip 2 hastalarında kan şekerinin regülasyonunda olumlu etkisi olabileceği gösterilmiştir (114, 132). Günde 3 defa 1-2 gr tarçının verilmesi her biri metabolik sendromun konponentleri de olan sistolik kan basıncı, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserid düzeyleri üzerinde olumlu etki göstermektedir (9, 112, 132).

2.2.4.5. Kanserle ilişkili etkiler

Kolorektal, meme, böbrek, akciğer, deri, ağız, karaciğer, prostat kanseri, lösemi ve glioblastom gibi çeşitli kanserle ilişkili invivo/invitro çalışmalarda tarçın bileşikleri ve CBO'nun farklı mekanizmalar üzerinden kanser progresyonunu, invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (9, 119, 132, 135, 137). Antioksidan etki başlığı altındaki özetlenen mekanizmalardan başka immünstimülan etki gösterdiği, vasküler endotelial growth faktör inhibisyonu yaparak kanserle ilişkili anjiogenezi inhibe edebildiği bildirilmektedir (9, 132).

2.2.4.6. Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

Tarçın, yara iyileşmesi sırasında kollajen yapımını stimüle ederek, yara kontraskiyon ve epitelizasyonu artırarak olumlu etkiler göstermektedir. CBO yara iyileşmesinde inflamasyonu azaltarak, fibroblast, hücre proliferasyonu, keratin sentezi ve re-epitalizasyonu artırarak olumlu etki göstermektedir. Bütün bunlardan daha da önemlisi sinnamaldehit, endotelial hücre proliferasyonu yaparak yara iyileşmesinde kritik basamak olan anjiogenezisi uyarmaktadır (9).

2.2.4.7. Anti-anksiyete ve Anti-depresan etkileri

CBO'nun anksiyete ve depresyonda etkili olduğu gösterilmiştir (138).

2.2.5. Cinnamon Bark Oil'in Nörolojik Hastalılardaki Etkileri

2.2.5.1. İskemik beyin dokusunda anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri

İskemi oluşturulmuş farklı deneysel modellerde CBO'nun majör bileşiği olan sinnemaldehit ve tarçının içeriğindeki diğer bileşiklerin, iskemik hücrelerde azalmış olan glutamat geri alımını düzelttiği, hücre içi artmış kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak mitokondriyal depolarizasyonu düzelttiği saptanmıştır (11, 139). İskemik dokuda iNOS salınımını baskılamak, glutatyon düzeyini, SOD, katalaz ve glukoz oksidaz gibi antioksidan etkili enzim aktivitelerini arttırmak suretiyle ROS/RNS düzeyini azalttığı ve sonuç olarak antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur (14). Buna ek olarak, anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkilerini TNF- α , IL-1 β , bir kemokin olan monosit kemotaktan protein (CCL2) ve endotelial-lökosit adhezyon molekülü-1 düzeylerini azaltarak göstermektedir (13).

İskemi/reperfüzyon hasarında da tarçın ve CBO'nun anti-oksidan, anti-inflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir. Trans-sinnamaldehyd, NO ve fosfoinosit 3-kinaz/Akt (PI3 K/Akt) inhibisyonu yaparak, TNF- α , iNOS ve siklooksijenaz-2 (COX-2) seviyelerini önemli ölçüde azaltarak nöroprotektif etki göstermektedir (140). Ayrıca intrasellüler ROS sentezini azaltarak mitokondriyal membran depolarizasyonu düzelttiği ve apoptotik hücre oranını azalttığı bulunmuştur (12).

2.2.5.2. Nörodejeneratif hastalıklarda etkileri

Nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde çok sayıda faktör rol oynasa da, iskemide olduğu gibi nöroinflamasyon ve oksidatif stres temel mekanizmalardır (141, 142).

Parkinson Hastalığında (PH) etkileri

DJ-1 Protein (PARK7), nöronları oksidatif stresle ilişkili hasardan koruyan başlıca nöroprotektif proteinlerden biridir. DJ-1 genindeki mutasyonlar, otozomal resesif geçişli erken başlangıçlı PH ile ilişkilendirilmiştir. Sinemaldehidin anti-inflamatuar etkili metaboliti olan sodyum benzoat, *DJ-1* geninin ekspresyonunu mevalonat metabolitleri üzerinden sağlamaktadır (143). Buna ilaveten sodyum benzoat, başlıca nöron ve astrositlerden salınan ve dopaminerjik nöronlar üzerinde nörotrofik etkileri olan beyin kaynaklı nörotropik faktör (BDNF) ve neurotrophin-3 (NT-3) salınımını arttırmaktadır (144). Sodyum benzoat, astrosit ve mikroglıadan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltmaktadır (141).

Deneyisel fare modelinde (MPTP ile oluşturulmuş) tarçının beyin ve kan hücrelerinde sodyum benzoat yapımını arttırmak suretiyle iNOS'un nıgral ekspresyonunu azalttığı, nöroprotektif proteinler olan Parkin ve DJ-1 proteinlerinin sentezini artırarak dopaminerjik nöronları koruduğu, nigrostriatal nörotransmitter salınımını dengede tutarak motor fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (145).

Tarçın içeriğindeki bileşikler ve sodyum benzoat, PH'nın karakterisik patolojisi olan α -sinnüklein birikimini azalttığı gibi klinik olarak motor ve kognitif fonksiyonlarda düzelme de sağlamaktadır (141, 146). Bütün bu mekanizmalardan farklı olarak sinemaldehidin, PH patogeneğinde rol oynadığı ileri sürülen nöronlarda bozulmuş otofaji fonksiyonunu düzelterek ve apoptozu inhibe ederek nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (14, 147).

Alzheimer Hastalığında (AH) etkileri

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH'da ekstrasellüler amiloid (A β) plaklar ve intrasellüler tau nörofibriller yumak oluşumu patognomiktir. Tarçın ekstraktlarının amiloid (A β) plakların oluşumunu, tau'nun filament formasyonuna dönüşümünü ve birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak tau'nun çift helikal yapısında temel değişikliklere neden olan rekombinant tau filamenlerinin de uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu etki tarçındaki proantosiyanın molekülü ile ilişkili

bulunmuştur (114, 132). AH'da patogenetik mekanizmalardan biri de sinaptik kayıpla ilişkili asetil kolin eksikliğidir. Bu nedenle asetilkolini asetat ve koline dönüştüren antikolinesterazların inhibitörleri tedavide kullanılmaktadır. Tarçının fenol bileşikleri, AH tedavisinde kullanılan antikolinesteraz inhibitörlerine benzer bir etki göstermektedir (134).

Deneyisel AH modelinde sinnamaldehitin metaboliti olan sodyum benzoatın mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuar yanıtı azalttığı, aktive mikrogliadan ROS üretimini azaltarak oksidatif stresi düşürdüğü, nöronal apoptozu baskıladığı ve bellek kaybını azalttığı gösterilmiştir (148-150).

Tarçın ve sinnamaldehit, bu antioksidan ve anti-inflamatuar etkileriyle amiloid (A β) plakların yapımını ve tau proteinin birikimini inhibe ederek beyni nörotoksik etkilerden korumaktadır ayrıca kognitif fonksiyonların da düzelmesini sağlamaktadır. Tarçındaki fenol bileşiklerinin endotel hücrelerinde vasküler adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak anti-inflamatuar etkilerinin olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler ışığında özellikle sinnamaldehit ve polifenol yapıdaki bileşiklerin AH'da proflaktik etkili ve/veya progresyonu yavaşlatmada etkili ve güvenli bir tedavi yaklaşımı olabileceği ileri sürülmektedir (148, 151, 152).

Multipl Sklerozda Etkisi

Multipl skleroza karşılık gelen deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde, tarçının spinal korda mononükleer hücrelerin infiltrasyonunu ve iNOS, IL-1 β gibi inflammatuar moleküllerin salınımını inhibe ederek inflamasyonu baskıladığı, kan-beyin bariyeri bütünlüğünü korumada etkili olduğu ayrıca myelin genlerinin ekspresyonunu ile demyelinizasyonu baskılıyarak remyelinizasyonu arttırdığı saptanmıştır (153, 154). Sodyum benzoatın, ensefalotojenik T hücrelerin üretimini inhibe ederek ensefalomyelit progresyonunu yavaşlattığı ve klinik semptomları düzelterek relapslardan koruduğu gösterilmiştir (149, 155).

2.3. Çalışmada Kullanılan Enzim ve Moleküller

a) Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzimi

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan ve toksik özellikte olan süperoksit anyon radikalini (O_2^-) birini moleküler oksijene (O_2) yükseltgeyip diğer bir süperoksit radikalini ise daha az toksik olan hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenmesini katalizleyen

endojen kaynaklı bir antioksidan enzimdir. Bu enzim sayesinde süperoksit radikalının hücresel düzeyi kontrol altında tutulur (78, 156). İnsanlarda SOD'un 3 tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan Cu/Zn SOD (SOD1), mitokondride bulunan Mn SOD (SOD2) ve ekstrasellüler alanda bulunan Cu/Zn SOD (SOD 3) (157).

b) Total Glutasyon (tGSH)

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli enzimatik olmayan antioksidan bileşiktir. Periferde karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ -glutamil sistein sentaz ve glutasyon sentaz enzimleri katalizördür (78, 158). Beyin dokusunda astrositler tarafından sentezlenmekle birlikte nöronlarda bulunan başlıca antioksidan bileşiktir (159).

GSH, oksijen ve diğer bileşiklerin zararlı etkilerine karşı hücrenin korunması, hücre içi redoks dengesinin sağlanması, nöronal antioksidan sistemlerin korunması için gerekli glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde, DNA ve protein sentezinde, lipidler/proteinlerin oksidatif hasardan korunmasında, enzim aktivitesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi hücresel temel koruyucu mekanizmalarda rol oynamaktadır (78, 98, 158, 159). Tiyol yapısında olan GSH, ROS ile doğrudan tepkimeye girerek onların detoksifikasyonunu sağlar. Endojen üretilen peroksidlerin oksidasyon yoluyla zararsız hale gelmelerini sağlar (86, 160). Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (161, 162). GSH'ın intrasellüler konsantrasyonu iskemiye bağlı oluşan glutamat eksitotoksitesisi ve oksidatif stres durumunda nöronların canlılığını korumada temel rol oynar (64). Serebral iskemide GSH düzeyi azalmaktadır (160).

c) Malondialdehid (MDA)

MDA; ROS aracılığıyla hücre lipidlerinin zincirleme bir reaksiyonla okside edilerek yapılarının bozulması sonucu oluşan lipit peroksidlerin yıkımıyla açığa çıkan ana metabolittir. Çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonun ana ve en çok çalışılan ürünü olan MDA, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (85, 86, 163). Kimyasal olarak kararlı, ROS'a göre membranlardan daha kolay geçebilen MDA'nın proteinler ve DNA gibi biyomoleküller ile reaksiyona girme kabiliyeti yüksektir. MDA proteinleri ve fosfolipidleri çapraz bağlayarak membranda polimerizasyona, iyon

taşıması ve enzim işlevlerinin bozulmasına neden olmaktadır (86, 163). Hücre membranının stabilizasyonunun bozulmasıyla membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği bozulur ve hücre içi kalsiyum birikimi hücre ölümüne yol açar. Aşırı MDA üretimi oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir (86, 163).

d) Total Antioksidan Kapasite (TAK), Total Oksidan Kapasite (TOK), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Antioksidanlar serum veya plazmada etkileşim halinde ve sinerjik olarak hareket edebildiklerinden TAK'ın belirlenmesi, antioksidan durum hakkında tek tek antioksidan bileşiklerin belirlenmesinden daha fazla bilgi verebilmektedir (164, 165). Troloks eşdeğer antioksidan kapasite denilen bir yöntemle TAK ölçülebilmektedir. Bu yöntemde vitamin E, askorbik asit, β -karoten, flavonoidler, GSH, urat, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, albumin, glutatyon peroksidaz, selenyum, SOD ve katalaz düzeyleri değerlendirilmektedir (166). TAK düzeyinin düşük olması oksidatif stresin göstergesi başka bir deyişle oksidatif hasara yatkınlığın arttığını gösterebilmektedir (167).

Vücut sıvılarında bulunan bütün oksidan moleküllerin konsantrasyonu toplam etkisi TOK'yi yansıtmaktadır. Oksidatif stresin hücrel enzimlerin aktivasyonu ile sonuçlanan oksitotoksosite gibi farklı mekanizmalar yoluyla inme progresyonuna yol açtığı bilinmektedir (168). Toplam oksidatif durum genellikle serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki bir denge olarak tanımlanır (168).

OSİ, oksidatif dengeyi gösteren bir indekstir. OSİ hesaplamalarında TOK (mikromol H_2O_2 eşdeğer/L)/TAK (mikromol eşdeğer trolox/L) formülü kullanılmaktadır.

e) Interlökin-1 (IL-1)

IL-1'in IL- α ve IL- β olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Aktive mikrogliya tarafından sentezlenen bir inflamatuvar sitokin olarak bilinir fakat IL- β nörovasküler ünite de sentezlenmektedir (82, 91). İskemik dokuda endotel hücrelerini aktive ederek sitokinlerin, kemokinlerin, adhezyon moleküllerin salınımını artırır ve MMP-9'un aktivasyonunu sağlar (91, 169). Ayrıca inflamatuvar yanıtta mikrogliya aktivasyonuna yol açan NF- κ B sinyal yolunu aktive etmektedir (82). Bu iki izomer form başlıca tip I ve tip II denilen reseptörler üzerinden etki gösterir. Tip I reseptörleri pek çok hücre yüzeyinde bulunur ve her iki form da bağlanabilmekte iken tip II reseptörleri sadece nötrofil, B tipi lenfosit ve makrofaj yüzeyinde bulunur ve bu reseptörlere sadece IL- β bağlanabilmektedir (82).

f) Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)

TNF- α başlıca aktive mikroglıadan salgılanan nörotoksik etkili inflamatuvar bir sitokindir (91). Bununla birlikte nötrofillerden, perivasküler makrofajlar, serebral damarlar ve meninkslerde bulunan mast hücreleri, monositlerden köken alan doku makrofajlarından ve T lenfositlerden de salgılanmaktadır (21). Kapillerlerdeki perisit hücrelerinden IL-6 salınımını, MMP ve apoptotik faktörlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır (91). IL-1 gibi inflamatuvar yanıtta mikroglia aktivasyonuna yol açan NF- κ B sinyal yolunu aktive etmektedir (82). TNF- α mikrovasküler endotel hücrelerinden siklooksijenaz 2 (COX2) salınımını indükleyerek KBB’de permabilite artışına neden olmaktadır (93). Buna ek olarak TNF- α KBB yapısında bulunan proteinlerin (klaudin-5, okludin, ZO-1 gibi) sentezini azaltarak KBB’nin stabilitesinin bozulmasına neden olmaktadır (91). TNF- α , I/R hasarı sonrası görülen hücre ölüm mekanizmalardan biri olan nekroptozu başlatan yolu aktive etmektedir (79).

g) Miyeloperoksidaz Enzimi (MPO)

MPO enzimi başlıca iskemik dokuya geçen nötrofillerde ayrıca aktive mikroglial hücreler, nöronlar ve astrositlerde bulunur (170). MPO enzimi H₂O₂’den güçlü bir oksidan olan hipoklorik asit (HOCl) oluşumunda rol oynamaktadır. Yapı olarak çok reaktif özellikte olan HOCl endotel hücrelerinin, lipidler, proteinler gibi birçok biyolojik molekölü oksitleyerek yapısını bozmaktadır (171, 172). Asidik pH ortamda aktivitesi artmaktadır. MPO enzimi aktive olduğunda ROS ve RNS sentezini arttırarak nöroinflamatuvar yanıtı başlatan mikroglia ve nötrofil aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle MPO enzimi, serebral I/R hasarında hem oksidatif stresi hem de nöroinflamasyonu tetikleyen önemli bir inflamatuvar enzim olarak kabul edilir (170).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmanın Düzeni

Bu çalışmanın protokolü İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek, 25.02.2020 tarihli toplantısında 2020/3-8 karar sayısı ve 9452 HAYBİS kayıt numarası ile onaylanmıştır.

Ratlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi ve çalışma sonuna kadar takipleri bu merkezde yapıldı.

Çalışmanın deneysel bölümü İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında standart cerrahi aletler kullanılarak yapıldı. Deney sırasında doku örnekleme, serum elde etme ve dokuların saklanması için gerekli malzemeler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarının olanakları kullanılarak sağlandı.

Histopatolojik preparatların hazırlanması ve değerlendirilmesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Doku örneklerinden yapılan biyokimyasal ölçümler İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarında ve solid organ hasarını değerlendirmek üzere kanda bakılan parametreler Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında hizmet alımı yapılarak değerlendirildi.

3.2. Deney Hayvanları ve Barındırma

Çalışmada, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış, sağlıklı ve ağırlıkları 228-333 gr arasında değişen, 5-6 aylık 44 adet *Wistar albino* cinsi dişi ratlar kullanıldı.

Deney süresince ratların tümü sabit oda sıcaklığında ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) ve nemde ($\%60\pm5$), 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngü şeklinde ışık almaları sağlanan şeffaf plastik materyalden yapılmış konvansiyonel kafeslerde barındırıldı. Ratlar kafes tellerinin üzerinden sunulan 8 milimetre'lik standart pelet yem ve paslanmaz çelik bilyeli suluklarda günlük taze içme suyu ile *ad libitum* beslendi.

3.3. Global İskemi/Reperfüzyon (I/R) Modelinin Oluşturulması

Anestezi prosedürü

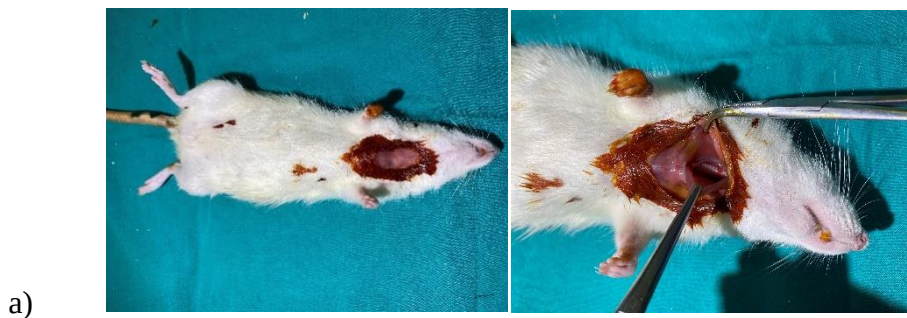
Deney hayvanlarının anestezisi, 12 saat öncesinden aç bırakılarak, spontan solunumda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan ketamin hidroklorür (Ketasol %10 Richter Pharma AG, Wels, Avusturya; CAS numarası: 1867-66-9; 75 mg/kg) ve xylazine hidroklorür (Xylazinbio %2 Bioveta a. s., Ivanovice na Hané, Çekya; CAS numarası: 23076-35-9; 10 mg/kg) karışımı ile sağlandı. Ratların anestezisi pençe çekme yanıtları kontrol edilerek ve deney sırasında spontan solunumları devam edecek şekilde ayarlandı. Anestezinin idame ettirilebilmesi için ihtiyaç halinde ketamin hidroklorür ek dozları i.p. olarak verildi. Anestezi süresince ratların rektal vücut sıcaklığı 37.5-38.5°C arasında sabit tutuldu.

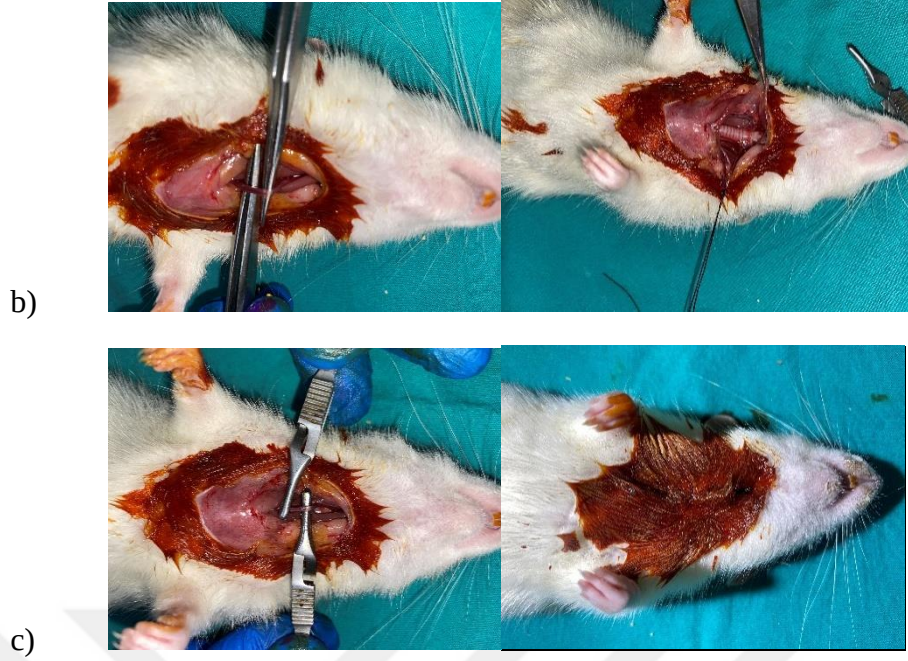
Cerrahi prosedür

Anestezi sağlandıktan sonra ratlar supine pozisyonunda operasyon masasına sabitlendi. Global serebral I/R modeli için uygulanan cerrahi işlem literatürde daha önce tanımlanmış yöntemler gözden geçirilerek seçildi (173, 174).

İnsizyon yapılacak bölge %10 povidon iyot ile dezenfekte edildikten sonra pretrakeal orta hatta cilt insizyonu yapılarak her iki CCA etrafındaki diğer dokulardan ve nervus vagustan dikkatle ayrılarak ortaya çıkarıldı (Şekil 3.1a). Her iki CCA'nın eş zamanlı olarak tek bir noktadan klemlenebilmesi için önce sol CCA ile nervus vagus ayrılarak cerrahi ipek iplikle işaretlendi (Şekil 3.1b). Daha sonra sağ CCA ile nervus vagus ayrıldı.

Deney gruplarındaki ratlarda, tek bir noktadan her bir arter için tek bir mikro klemp kullanılarak ve klempler eş zamanlı 15 dakika kapalı tutularak iki yanlı CCA'lar oklude edildi. Bu iskemiye maruz bırakma işlemin ardından klempler açıldı, cilt ve cilt altı doku 3-0 ipek ile kapatılıp, yara yeri %10 povidon iyot ile dezenfekte edildi. Ratlarda 72 saat reperfüzyon sağlandı (Şekil 3.1c).





Şekil 3.1. Deney sırasında uygulanan cerrahi prosedürde bilateral karotis kommunis arterlerin oklüzyon aşamaları

- a) Pretrakeal orta hat cilt insizyonu ve karotis kommunis arterlerin disseke edilmesi
- b) Trakea posterolateralinde bulunan sol karotis kommunis arterin ipek iplikle disseksiyonu
- c) Bilateral karotis kommunis arterlerin mikro klemplerle 15 dk oklüzyonu ve işlem sonrası sonrası cilt-cilt altı dokunun sütüre edilmesi

Ratların cerrahi işlem sonrası bakım ve beslenmesi

Ratlar 72 saat boyunca reperfüzyona bırakıldığı süre içinde her bir kafes içinde 4 rat olacak şekilde barındırıldı. Postoperatif analjezik ve antibiyotik kullanılmadı. Kafeslerin bulunduğu ortam sabit oda sıcaklığında ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve nemde ($60\pm 5\%$), 12 saatlik aydınlık-12 saat karanlık döngü olacak şekilde ayarlandı. Ratlar standart pelet yem ve içme suyu ile postoperatif *ad libitum* beslendi. Kafeslerin bakımı her gün yapılarak içme suları günlük değiştirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deney sonrası postoperatif bakım ünitesi ve ratların beslenmesi

3.4. Cinnamon Bark Oil'in (CBO) Hazırlanması

C.verum (Cinnamomum zeylanicum) tarçın kabuklarından buhar distilasyonu ile elde edilen Cinnamon Bark Oil (Sigma-Aldrich Missouri Amerika Birleşik Devletleri; CAS numarası: 8015-91-6; 100 mg/kg) hazır ticari ürün olarak temin edildi (Şekil 3.3).

Avrupa Farmakopesi monografına göre CBO; sineol (<%3.0), linalol (%1.0-6.0), β -karyofillen (%1.0-4.0), safrol (<%0.5), trans-sinamik aldehit (% 55-75), öjenol (<%7.5), kumarin (<%0.5), trans-2-metoksisinamilaldehit (%0.1-1.0), benzil benzoat (<%1.0) içermektedir (175). Avrupa Farmakopesi monografı EK-2'de yer almaktadır.

CBO uygulaması için ratlar ayrı ayrı tartılarak her bir rat için uygulanması gereken CBO miktarı 100 mg/kg dozunda hesaplandı (176). Ratların vücut ağırlığına göre hesaplanan CBO miktarları hassas terazide eppendorf tüp içerisinde tartılarak 1 ml hacminde taşıt çözücü olarak kullanılan ayçiçek yağı eklendi. Eppendorf tüplerinin vortekslenmesi ile CBO ile ayçiçek yağının homojen karışımı sağlandı. Daha sonra CBO içeren ayçiçek yağı, ratlar için spesifik orogastrik kanül yardımıyla 1 ml oral olarak uygulandı. İlaç uygulaması her gün aynı saatte yapılarak doz intervallerinin eşit olması sağlandı.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan cinnamon bark oil

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ratlar, SHAM gurubunda 8, diğer gruplarda 12 rat olacak şekilde basit randomize ve çift kör yöntemle dört gruba ayrıldı (tablo 3.1).

Grup I (SHAM):

Bu gruptaki ratlarda sadece orta hat servikal insizyonu yapıp başka hiçbir işlem yapılmadan 1, 24, 48 ve 72 saat sonra CBO'dan 100 mg/kg dozunda yukarıda tarif edilen yöntemle hazırlanan çözelti oral yol ile günde 1 defa uygulandı.

Grup II (iskemi+reperfüzyon):

Bu gruptaki ratlara yukarıda tanımlanan cerrahi prosedürle 15 dk iskemiye takiben 72 saat reperfüzyon sağlandı.

Grup III (CBO+iskemi+reperfüzyon):

Bu grup profilaksi grubu olarak oluşturuldu. Bu gruptaki ratlara cerrahi prosedür uygulanmadan 72, 48, 24 ve son doz cerrahi uygulanmadan 1 saat önce CBO'dan 100 mg/kg dozunda yukarıda tarif edilen yöntemle hazırlanan çözelti oral yol ile günde 1 defa uygulandı. Son doz verildikten sonra ratlar yukarıda tanımlanan cerrahi prosedürle 15 dk iskemi oluşturulduktan sonra 72 saat reperfüzyon sağlandı.

Grup IV (iskemi+reperfüzyon+CBO):

Bu grup tedavi verilen grup olarak oluşturuldu. Ratlar yukarıda tanımlanan cerrahi prosedürle 15 dk iskemide bırakılıp klempler açıldı ve reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon başladıktan 1, 24, 48 ve 72 saat sonra CBO'dan 100 mg/kg dozunda yukarıda tarif edilen yöntemle hazırlanan çözelti oral yol ile günde 1 defa uygulandı.

Tablo 3.1. Deney Gruplarının Sınıflandırılması

Gruplar	Grup Adı	Uygulanan İşlem
Grup I (n=8)	Sham-Kontrol	CBO
Grup II (n=12)	İskemi oluşturulan	İskemi+Reperfüzyon
Grup III (n=12)	Proflaksi verilen	CBO+İskemi+Reperfüzyon
Grup IV (n=12)	Tedavi edilen	İskemi+Reperfüzyon+CBO

(CBO; Cinnamon Bark Oil)

3.6. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

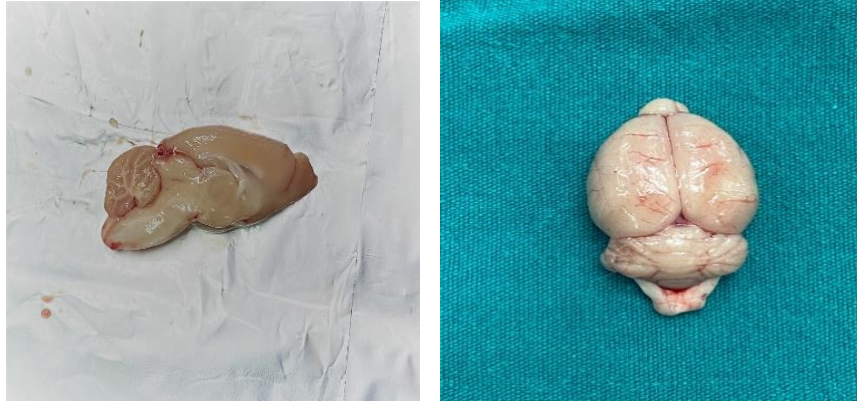
3.6.1. Sakrifikasyon İşlemi, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Tüm deney hayvanlarına iskemi ya da sham uygulamasını izleyen 72. saat sonunda ketamin hidroklorür (75 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (10 mg/kg) karışımının i.p. enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Ardından tüm ratlara torakotomi prosedürü uygulanarak intrakardiyak yolla kan alma işlemine geçildi. Tüm ratlardan sol ventriküle girilerek yaklaşık 6-8 cc kan alındı (Şekil 3.4). Alınan kanlar yarım saat oda sıcaklığında bekledikten sonra 2000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilerek elde edilen serumlar Turgut Özal Tıp Merkezi Biyokimya Merkez Laboratuvarı’nda hizmet alımıyla çalıştırılınca kadar Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Nöropsikofarmakoloji Laboratuvarında bulunan -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Kan alma bittiğinde bilateral fronto-parieto-oksiptal kraniektomi işlemine geçildi. Foramen magnum üzerinde kalan serebrum, serebellum ve beyin sapı anatomik bütünlüğü bozulmayacak şekilde tümüyle çıkarıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Ratlardan intrakardiyak yol ile kan örnekleri alınması



Şekil 3.5. Çıkarılan rat beyninin mezial ve süperiordan görünümü

3.6.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Sağ hemisfer biyokimyasal analizler için alüminyum folyo arasında -80°C’de muhafaza edildi. Sol hemisfer %10’luk formaldehit içerisinde alınarak rutin doku takibinden geçirildikten sonra parafine gömülüp hematoksilin-eozin (H&E) boyama için 5µ kalınlığında, immünohistokimyasal boyama için ise 3µ kalınlığında kesildi.

Dokuların Homojenizasyonu

Beyin dokusu 0.1 g tartılarak plastik tüplere alındı ve üzerine 1 mL PBS tamponu (pH 7.4) eklendi. Tartılan doku örnekleri buz izolasyonu altında bir homojenizatör yardımıyla doku örnekleri tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar daha sonra yine bir buz izolasyonu altında sonifikatör ile 30 saniyelik aralıklarla 4 defa 15 saniye sonifiye edildi. Sonifiye işlemi bittikten sonra homojenatlar 14.000 rpm’de soğutmalı santrifüj yardımıyla +4 °C’de 15 dakika santrifüj edildi. Son olarak, elde edilen süpernatantlar ölçüm işlemleri yapıncaya kadar +4 °C de muhafaza edildi.

3.6.3. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler olarak doku numuneler homojenatından; spektrofotometre ile SOD, tGSH ve MDA düzeyleri ölçüldü. Ayrıca beyin dokusunda TAK, TOK ve OSI değerlendirildi.

Beyin dokusunda inflamatuvar yanıtı değerlendirmek amacıyla MPO, IL-1 ve TNF- α düzeyleri bakıldı. Solid organ hasarını değerlendirmek üzere kanda AST, ALT, GGT, albumin, BUN, Cr düzeyleri Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında hizmet alımı yapılarak ölçüldü.

a) Total Protein Tayini

Örneklerdeki total protein konsantrasyonu hızlı ve basit bir yöntem olan Bradford yöntemi ile belirlendi (177). Homojenat örneklerine Bradford reaktifi eklenerek 550 nm'deki absorbans değişimi ölçülerek total protein miktarı belirlendi. Standart protein olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Total protein konsantrasyonu çalışılan biyokimyasal parametrelerin spesifik aktivelerinin değerlendirilmesinde normalizasyon faktörü olarak kullanıldı.

b) Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Dokulardaki SOD enzim aktivitesi ölçümü literatürde daha önce McCord ve ark. tarafından tanımlanmış olan yöntemle yapıldı (178). Yöntemin temeli: SOD enzim aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-c'yi indirgemesini engellemektedir. Bu yöntemde SOD enzim aktivitesi bu inhibisyonu ölçme esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyonu %50 inhibe eden SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi. SOD enzim aktivitesi 550 nm'de kinetik takip edilerek ölçüldü ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

c) Doku Total Glutasyon (tGSH) Ölçümü

Dokulardaki tGSH ölçümü Akerbom ve ark. tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak ölçüldü (179). Yöntemin temeli: Bu yöntem DTNB [5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)], NADPH ve glutasyon redüktaz'ın reaksiyonu sonucu oluşan 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) bileşiğindeki artışın 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Absorbans değişimi UV-vis spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda 15dk. takip edildi. Elde edilen sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

d) Malondialdehid (MDA) Ölçümü

MDA ölçümü literatürde daha önce Placer ve ark. tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak yapıldı (180). Yöntemin temeli: Peroksit lipidlerin yıkım ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda oluşan pembe renkli ürünün 532 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanıldı. Örneklerin MDA içeriği nmol/mg protein olarak ifade edildi.

f) Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü

MPO aktivitesi için doku örnekleri 0.1 g tartılıp buz izolasyonu altında homojenize edildi. Daha sonra peletleri ayırmak için örnekler 10.000 rpm'de 15 dakika +4 °C' de santrifüj edildi. Peletler süpernatandan ayrılarak üzerine %0.1'lik HETAB çözeltisine eklendi. Daha sonra solüsyonlar 15 saniye sonifiye edilerek -80 °C' de donduruldu ve ardından tekrar çözündürüldü. Bu sonifikasyon-dondurma-çözdürme işlemi peş peşe 3 kez uygulandı. Bunu izleyerek örnekler 15 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları alındı ve 96'lık well platelere 25 µL süpernatant ve 200 µL o-dianisidin çözeltisi (pH:6) eklendi. Bir mikropate okuyucu kullanılarak 460 nm dalga boyunda 5 dakika sonra absorbanslar ölçüldü. MPO aktivite sonuçları U/g yaş doku olarak verildi.

g) Total Antioksidan Kapasite (TAK) ve Total Oksidan Kapasite (TOK) Ölçümü

Doku homejanatlarındaki TAK düzeyi Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tip, Gaziantep, Türkiye) tarafından geliştirilen kit kullanılarak belirlendi (181). Bu yöntemle hidroksil radikali üretilir. Numunenin üretilen hidroksil radikallerine karşı antioksidatif etkisi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Sonuçlar, litre başına Trolox eşdeğerlerinin milimolleri (mmol eq trolox/L) olarak ifade edildi.

Doku homejanatlarındaki TOK düzeyi Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tip, Gaziantep, Türkiye) tarafından geliştirilen kit kullanılarak belirlendi (181). Yöntemin temeli şöyledir: Numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon o-dianisidin kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından arttırılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol turuncuyla renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen absorbans, numunede bulunan oksidan moleküllerin miktarı ile doğru orantılıdır. Standart olarak hidrojen peroksit kullanıldı ve sonuçlar mikromol H₂O₂ eşdeğer/L cinsinden ifade edildi.

h) Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

OSİ hesaplamak için $OSİ = TOK \text{ (mikromol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğer/L) / TAK (mikromol eşdeğer trolox/L)}$ formülü kullanıldı.

ı) Interlökin-1 (IL-1) ve Tümör Nekrozis Faktör-α (TNF- α) Ölçümü

IL-1 ve TNF- α düzeyleri Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd tarafından geliştirilen ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar ng/L olarak ifade edildi.

Biyokimyasal Analizler için Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada biyokimyasal analizler için İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

Çalışmada kullanılan cihazlar:

- Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Nüve, NF 800 R)
- Homojenizatör
- Sonifikatör (Bandelin)
- Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (Daihan, HP-LP1)
- Elektronik terazi (Shimadzu ATX224)
- Mikroplate Reader (BioTek)
- Uv-Vis spektrofotometre (Shimadzu-1601)
- Millipore Ultrasaf Su Cihazı

Biyokimyasal Analizler için Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanıldı. Kullanılan bu kimyasalların bazı özellikleri Tablo 3.2’de verildi. Ayrıca, çalışma kapsamında hazırlanan tüm sulu çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlandı.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Malzeme	Özellikler	Üretici Firma
5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	%99	Sigma-Aldrich, USA
β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)	%99	Sigma-Aldrich, USA
Glutasyon Redüktaz	%99	Sigma-Aldrich, USA
Sodyum hidroksit	$\geq$ %97,0	Merck, USA
Sitokrom-c	$\geq$ %95	Sigma-Aldrich, USA
Ksantin	$\geq$ 99%	Sigma-Aldrich, USA
Ksantin oksidaz	$\geq$ 99%	Sigma-Aldrich, USA
Hidrojen peroksit	%30'luk	Merck, USA
2-Tiyobarbitürik asit	$\geq$ 98%	Merck, USA
Triklorasetik asit	%99	Merck, USA

3.6.4. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme için sıçanların beyin dokuları 3-4 mm'lik küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra plastik doku takip kasetlerine konularak %10'luk formaldehit içerisinde 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından formaldehit solüsyonuna alınan beyin doku örneklerine Tissue-Tek VIP/SAKURA doku takip cihazında doku takip prosedürü uygulandı. Bu prosedüre göre 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkanan doku örnekleri dereceli alkollerde dehidrate edildi ve ksilende şeffaflaştırılıp parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5 μ m kalınlığında kesitler hazırlandı. Lamlar üzerine alınan kesitler genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Buna ilaveten apoptoza giden hücreleri gözlemlemek amacıyla immünohistokimyasal (IHC) boyamada; Bax [(Bax (B-9) sc-7480 Santa Cruz Biotechnology CA, USA] ve kaspaz-3 (Caspase 3 Ab-4; Neomarkers, Fremont, CA) immün boyama prosedürü uygulandı.

Serebral korteksde ve hipokampusde 10 farklı alanda X40 objektif kullanılarak dejenere nöronlar değerlendirildi. Hücre sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş nöronlar dejenere olarak tanımlandı ardından kaspaz 3(+) ve Bax (+) hücre sayısı hesaplandı.

Boyanan preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solution Ltd, Cambrige, UK) kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.3. Doku Takibi Prosedürü (Tissue-Tek VIP/SAKURA)

İşlem	Süre
1. Musluk suyu	1 saat
2. Musluk suyu	1 saat
3. %80 alkol	1 saat
4. %96 alkol	1 saat
5. %96 alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1 saat
8. Ksilen	1 saat
9. Ksilen	1 saat
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	1 saat
12. Parafin II	1 saat
13. Parafin III	1 saat
14. Parafin IV	1 saat

Tablo 3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü (Leica Aotostiner XL cihazı)

İşlem	Süre
1. İnkübasyon (60°C)	1 saat
2. Ksilen	5 dk x 3
3. %96 alkol	3 dk
4. %96 alkol	3 dk x 2
5. Absolü alkol	3 dk x 2
6. Musluk suyu	5 dk
7. Hematoksilen	10 dk
8. Musluk suyu	5 dk x 3
9. Eozin	2 dk
10. %96 alkol	3 dk x 2
11. Absolü alkol	3 dk x 2
12. Ksilen	5 dk x 3

Tablo 3.5. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

İşlem	Süre
1. Deparafinizasyon	-
2. Antijen Retrieval	15 dk, 121°C
3. Distile Su	1 dk
4. PBS	1 dk
5. Hidrojen Peroksit	10 dk
6. PBS	1 dk
7. Protein Blok	5 dk
8. Primer Antikor	40 dk
9. PBS	5 dk
10. Sekonder Antikor	20 dk
11. PBS	5 dk
12. Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk
13. PBS	1 dk
14. Kromojen	10 dk
15. PBS	1 dk
16. Distile Su	1 dk
17. Hematoksilen	2 dk
18. Musluk Suyu	1 dk x 3
19. Distile Su	1 dk

3.7. İstatistiksel Analizler

Veriler, ortalama±standart sapma ve ortanca (min-maks) olarak sunuldu. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle analiz edildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analiziyle (one-way ANOVA) ve normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılması ise Kruskal-Wallis H testiyle yapıldı. İstatistiksel analizlerde rat vücut ağırlıkları için anlamlı tek yönlü varyans analizi sonrası çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi kullanılırken; normal dağılım göstermeyen ratların beyin ağırlıkları, beyin dokusu oksidatif stres parametreleri ve inflamasyon parametreleri, serum biyokimyasal parametreleri için anlamlı Kruskal Wallis sonrası Mann Whitney U testi kullanıldı.

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 paket programı kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Rat Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Beyin ağırlığı yönünden karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Ratların deney başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).

Bulgular tablo 4.1 ve tablo 4.2’te özetlendi.

Tablo 4.1. Ratların Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Gruplar	Beyin ağırlığı (gr)	<i>p değeri</i>
Grup I	1.96 (1.62-2.23)	0.202
Grup II	2.00 (1.80-2.28)	
Grup III	2.11 (1.94-2.63)	
Grup IV	2.04 (1.86-2.21)	

Tablo 4.2. Ratların Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Vücut ağırlığı (gr)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	<i>p değeri</i>
Deney başlangıcı	280.6±23.3	247.8±11.4	260.6±22.9	262.0±27.8	0.082
Deney sonu	269.88±26.67	245.75±42.56	244.50±24.18	250.6±32.2	0.235

4.2. Histopatolojik Bulgular

Grupların histopatolojik bulgularının karşılaştırılması tablo 4.1’de özetlenmiştir.

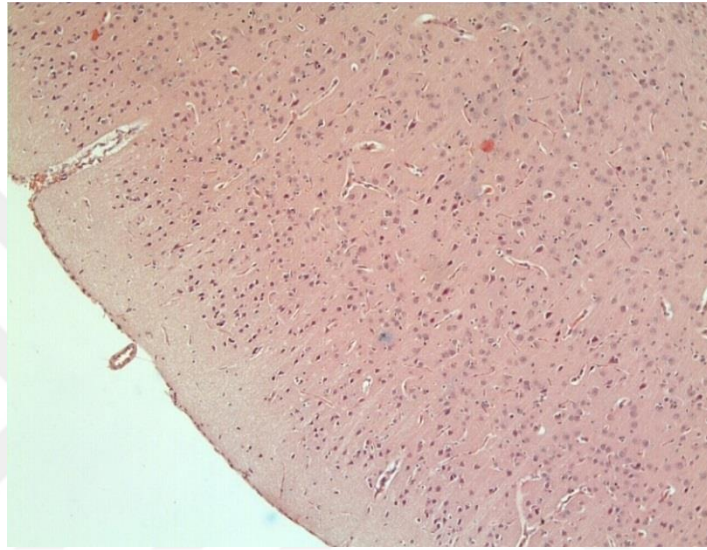
Sham Grubu

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde beyin dokusunda korteksin normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Nöronlar lamina moleküler tabakasında seyrek olarak izlendi. Bu tabakanın dışındaki serebral korteks tabakalarında ise nöronlar daha yoğun ve homojen olarak dağılmıştı (Şekil 4.1). Nöronların arasında

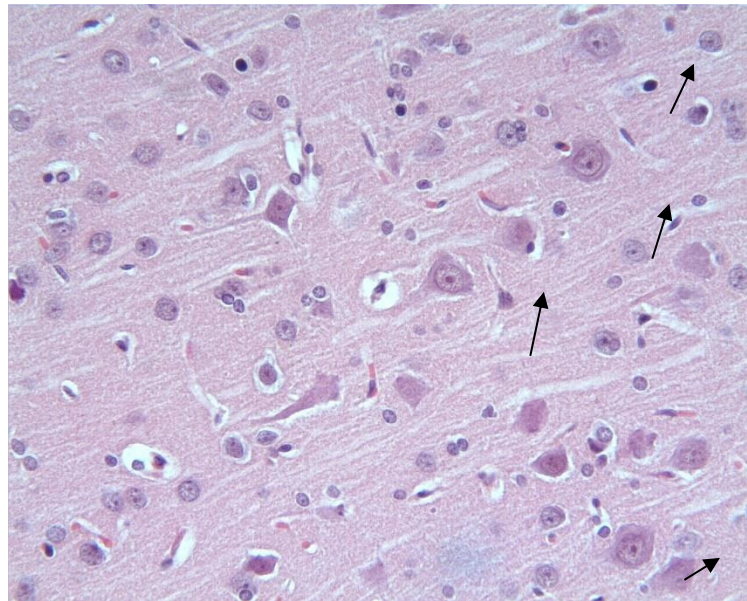
üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlara rastlandı (Şekil 4.2). Bu grupta hipokampus bölgesi de normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Kaspaz-3 boyama metodu uygulanmış kesitlerde kaspaz-3 (+) hücre sayısı korteksde 0.17 ± 0.37 (Şekil 4.5) ve hipokampusde 0.11 ± 0.32 (resim 4.6) olarak tespit edildi.

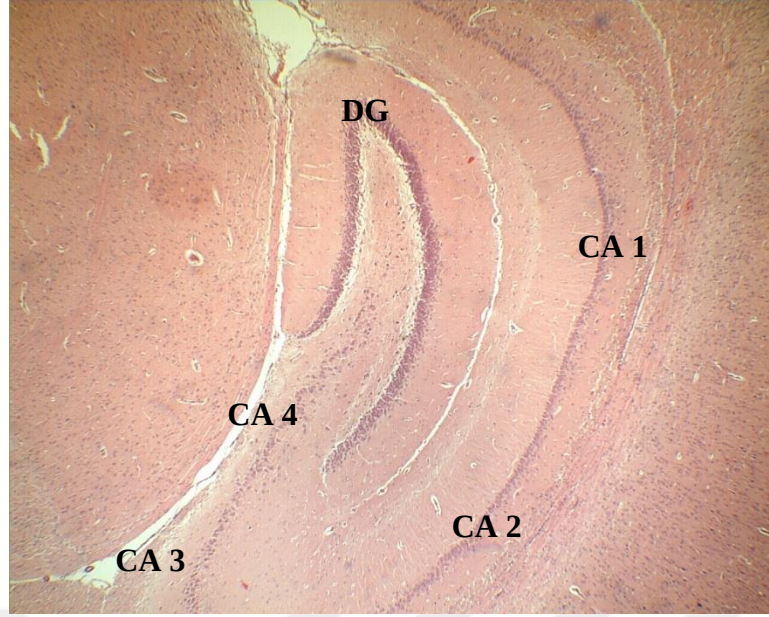
Bax boyama metodu uygulanmış kesitlerde korteksde Bax (+) hücre sayısı 0.20 ± 0.40 (Şekil 4. 7) ve hipokampusde 0.04 ± 0.20 (Şekil 4.8) olarak tespit edildi.



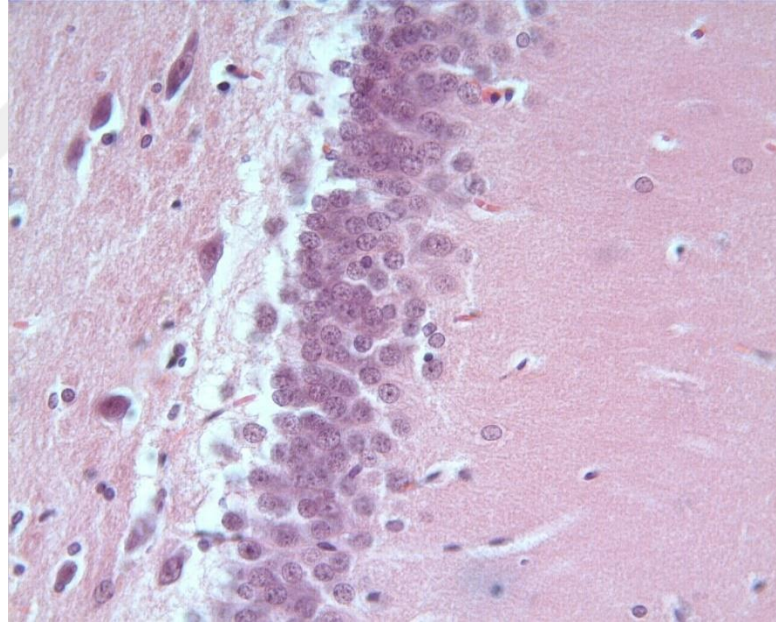
Şekil 4.1. Sham grubu: Serebral korteksin normal histolojik görünümü ve lamina molekulare tabakası (yıldız) H-E; X100.



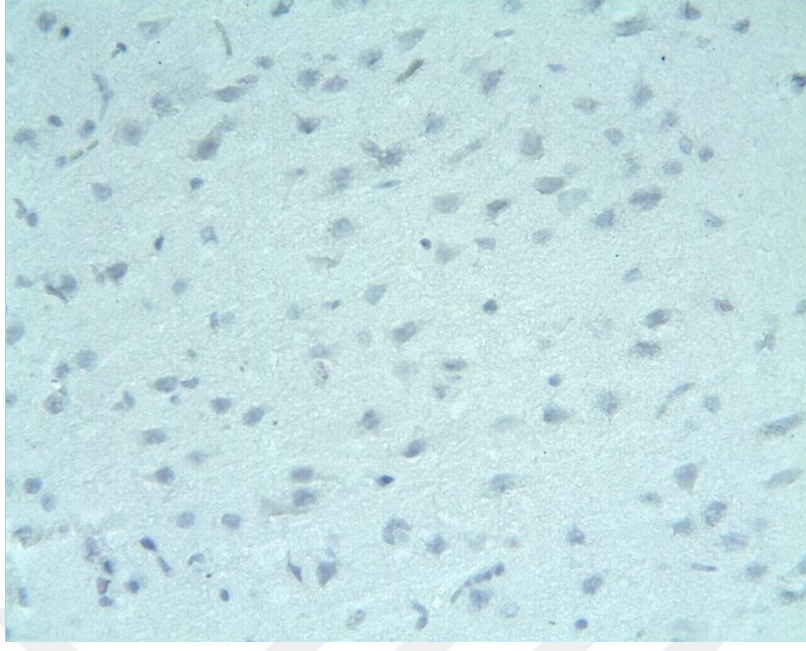
Şekil 4.2. Sham grubu: nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X400.



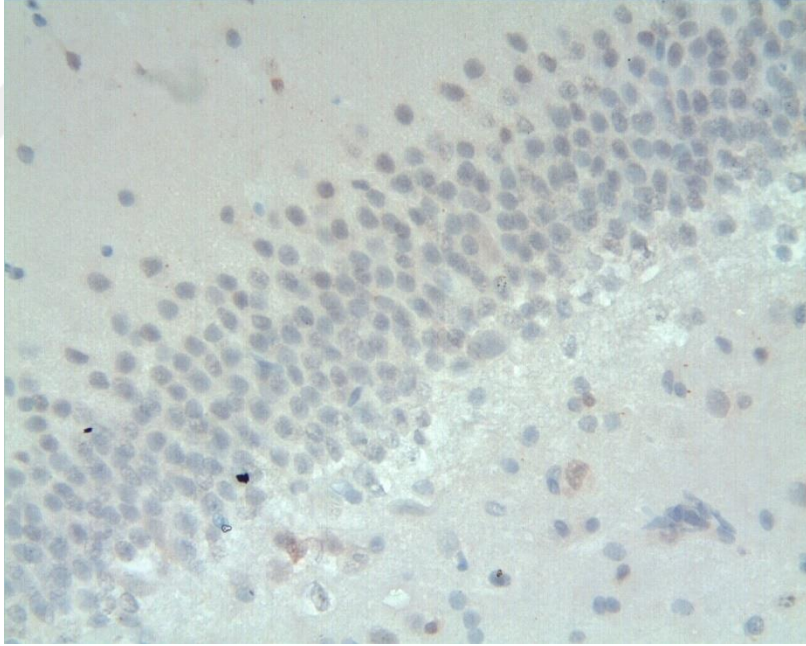
Şekil 4.3. Sham grubu: Hipokampüsün normal histolojik görünümü. Dentate gyrus (DG) ve Cornu ammonis (CA-1,2,3 ve CA-4 alanları) H-E; X40.



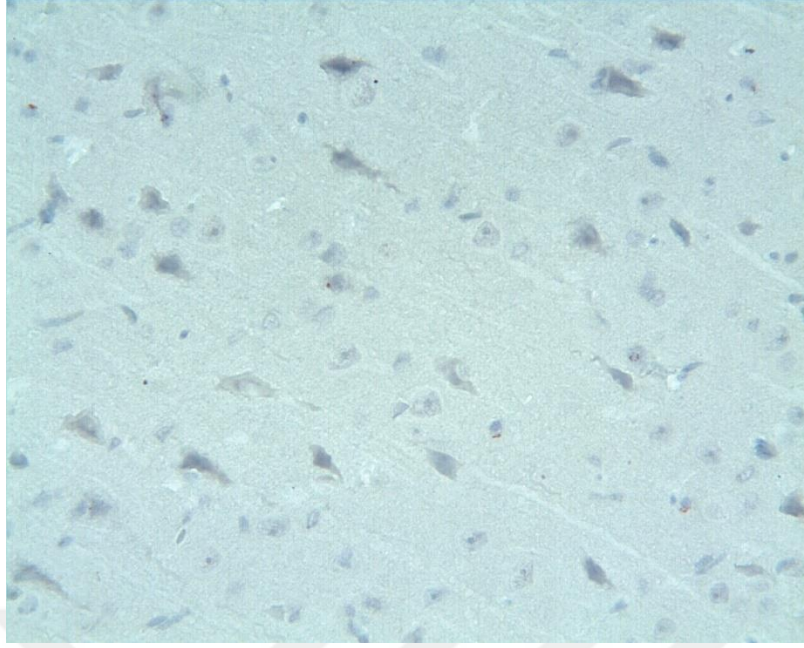
Şekil 4.4. Sham grubu: Hipokampüsün normal histolojik görünümü H-E; X400.



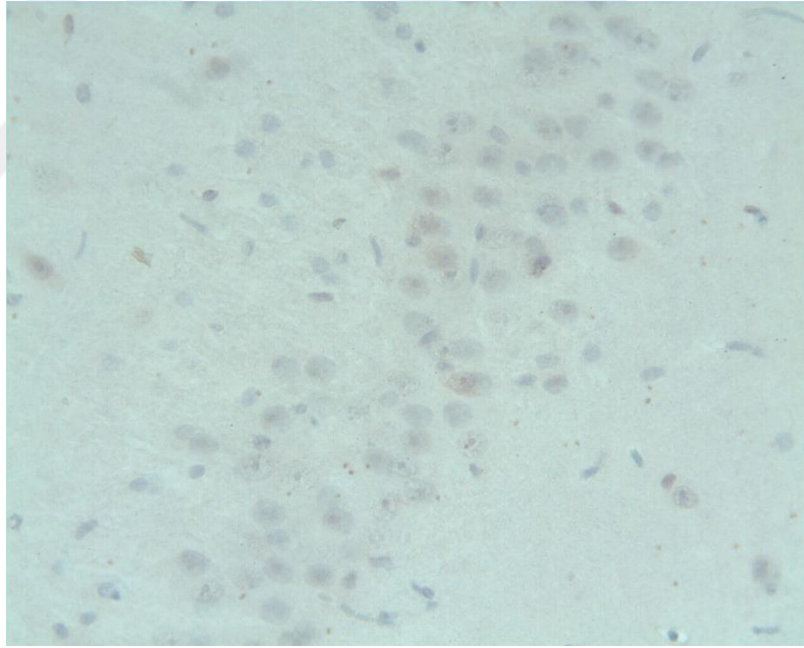
Şekil 4.5. Kontrol grubu: Korteks alanı kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesit;
X400.



Şekil 4.6. Sham grubu: Hipokampus alanı kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesit;
X400.



Şekil 4.7. Sham grubu: Korteks alanı; Bax boyama metodu uygulanan kesit, X400.



Şekil 4.8. Sham grubu: Hipokampus alanı, Bax boyama metodu uygulanan kesit; X400.

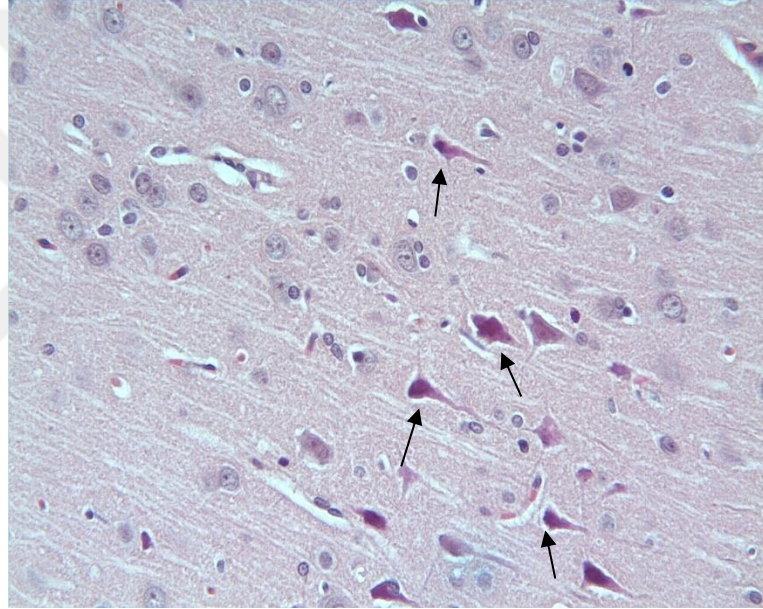
Grup II (iskemi+reperfüzyon):

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde serebral korteksde ve hipokampusde düzensiz sınırlı, sitoplazması asidofil ve nükleus yoğunluğu artmış dejenere nöronlar görüldü (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Dejenere nöronların sayısı bu grupta korteksde 6.24 ± 0.22 , hipokampusde 6.28 ± 2.45 olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile

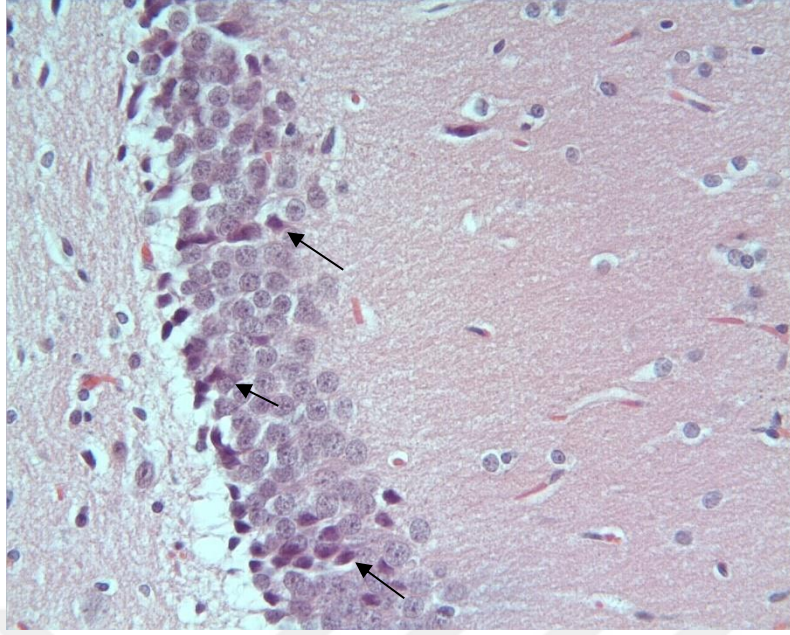
karşılaştırıldığında korteks ve hipokampus bölgelerinde dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.0001$).

Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde kaspas-3 (+) hücre sayısı korteks 7.04 ± 2.04 ve hipokampusda 3.60 ± 1.33 olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta kaspaz-3 (+) hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.0001$) (Şekil 4.11, Şekil 4.12).

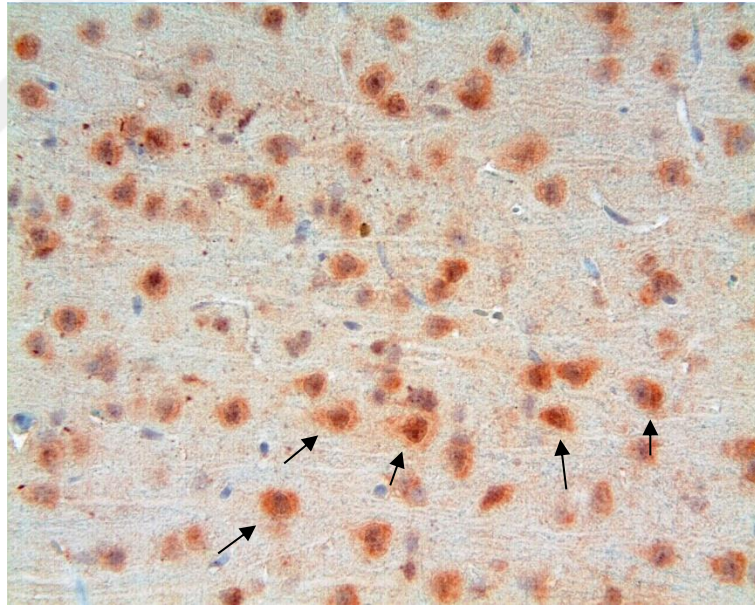
Bax boyama metodu uygulanan kesitlerde Bax (+) hücre sayısı korteks 9.67 ± 2.95 ve hipokampusda 11.95 ± 3.75 olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta Bax (+) hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.0001$) (Şekil 4.13, Şekil 4.14).



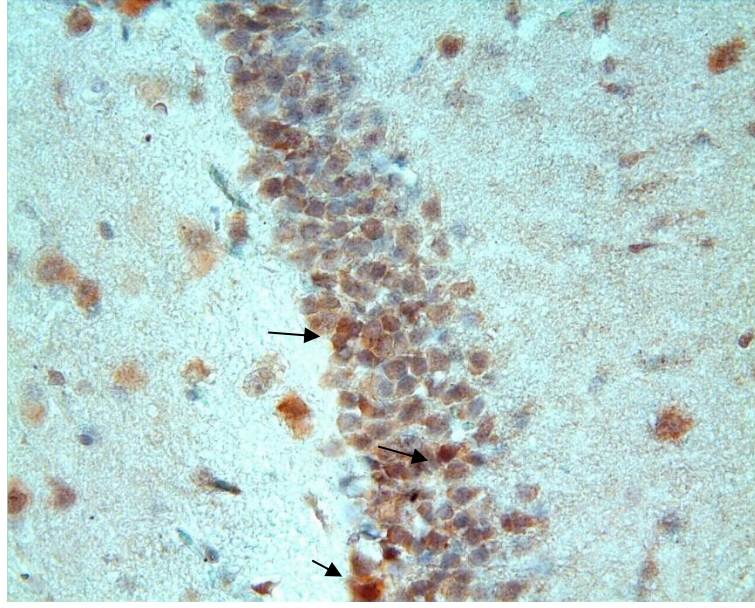
Şekil 4.9. I/R grubu. Sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



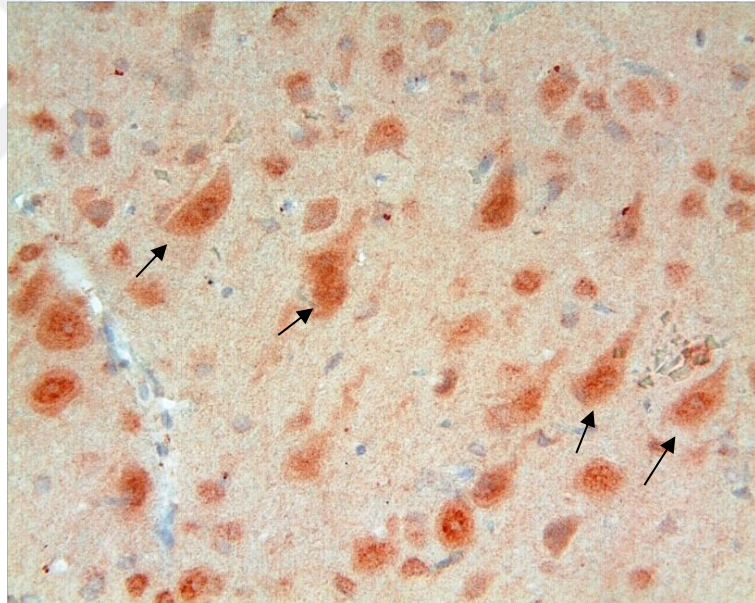
Şekil 4.10. I/R grubu. Hipokampüste sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



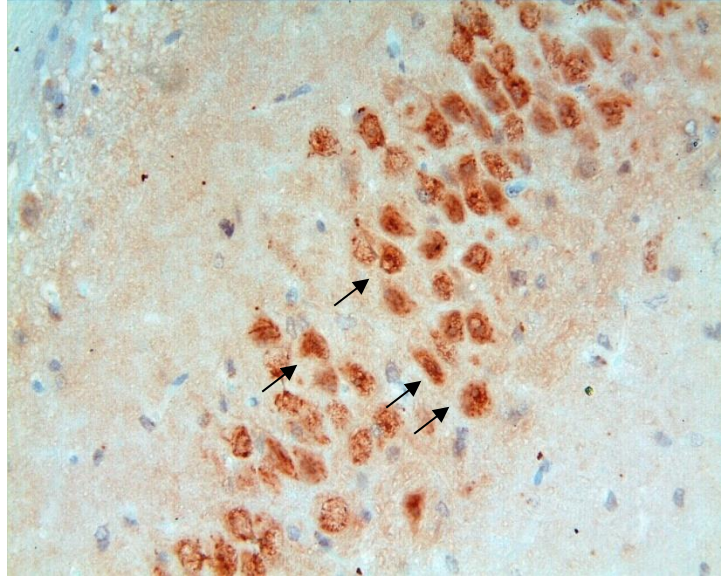
Şekil 4.11. I/R grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.12. I/R grubu. Hipokampüste kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.13. I/R grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.



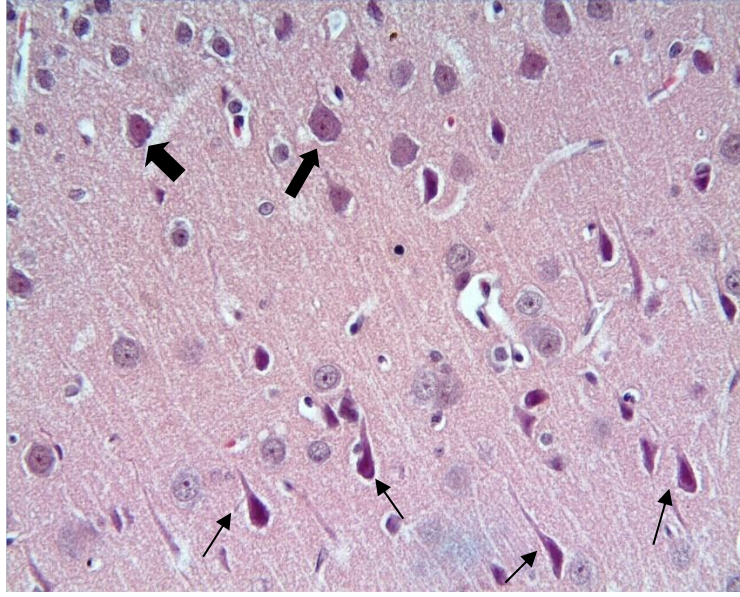
Şekil 4.14. I/R grubu. Hipokampüste bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.

Grup IV (I/R+CBO Grubu)

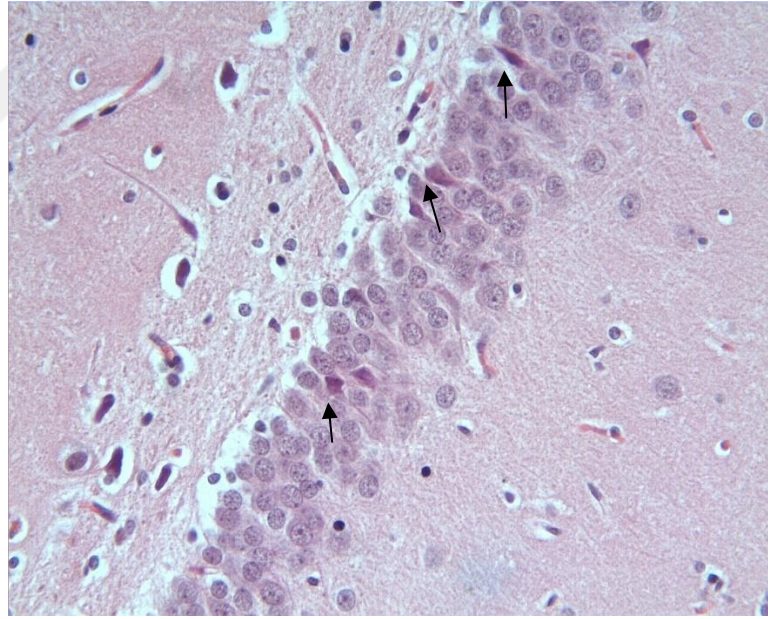
Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde dejenere nöronların sayısı bu grupta korteksde 2.61 ± 1.56 , hipokampüste 1.70 ± 1.60 olarak tespit edildi (resim 4.15, resim 4.16). I/R grubu ile karşılaştırıldığında korteks ve hipokampus bölgelerinde dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p < 0.0001$).

Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde kaspas-3 (+) hücre sayısı korteks 1.38 ± 1.27 ve hipokampüste 3.60 ± 1.33 olarak tespit edildi. I/R grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0.0001$) (Şekil 4.17, Şekil 4.18).

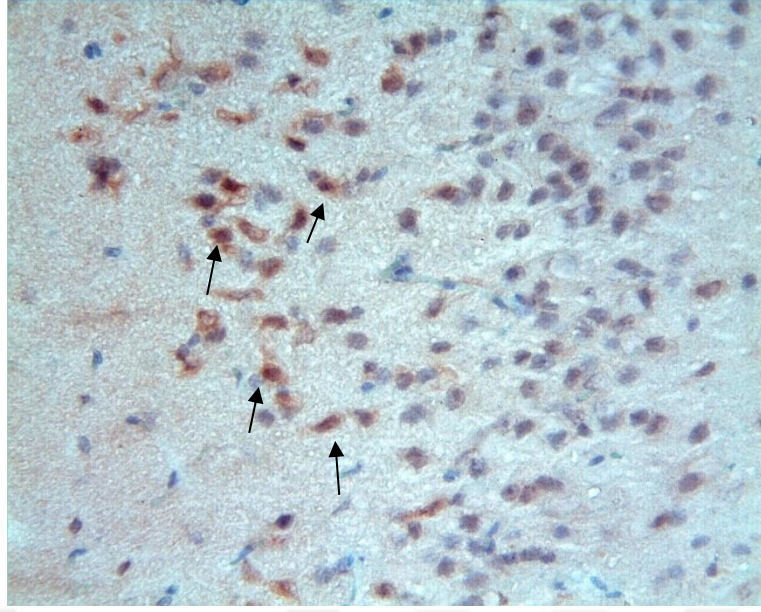
Bax boyama metodu uygulanan kesitlerde bax (+) hücre sayısı korteks 6.90 ± 2.87 ve hipokampüste 9.47 ± 1.62 olarak tespit edildi. I/R grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0.0001$) (Şekil 4.19, Şekil 4.20).



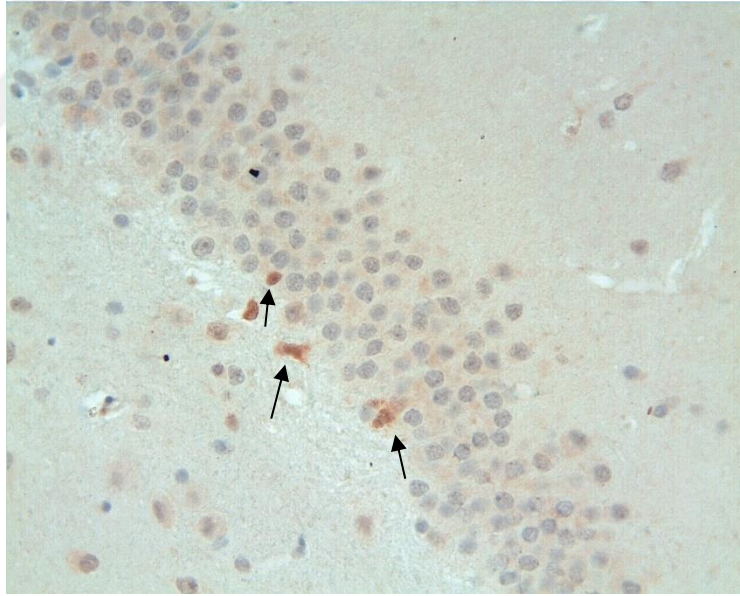
Şekil 4.15. I/R+CBO grubu. Sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



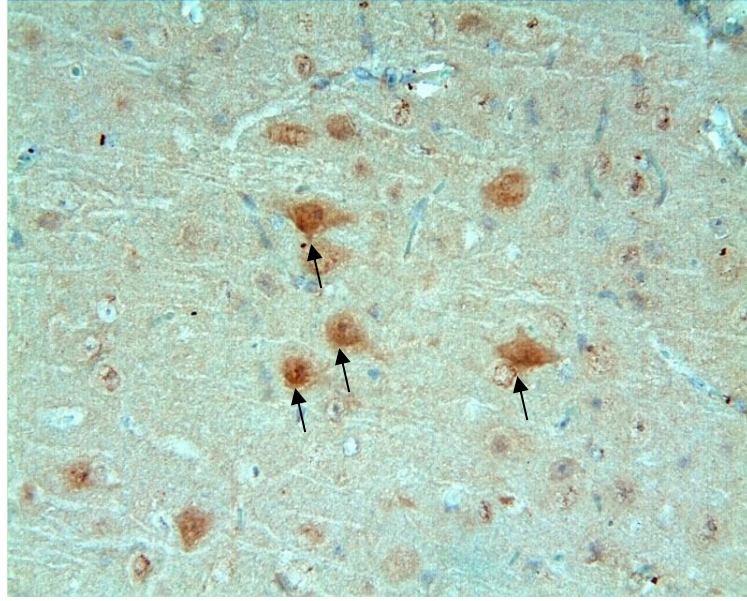
Şekil 4.16. I/R+CBO grubu. Hipokampüste sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



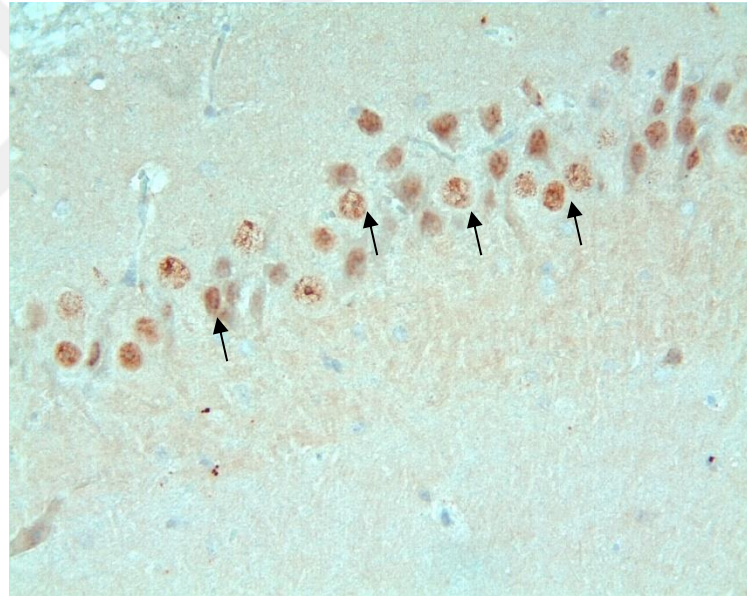
Şekil 4.17. I/R+CBO grubu. Korteksde kaspaz-3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.18. I/R+CBO grubu. Hipokampüste kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.19. I/R+CBO grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.



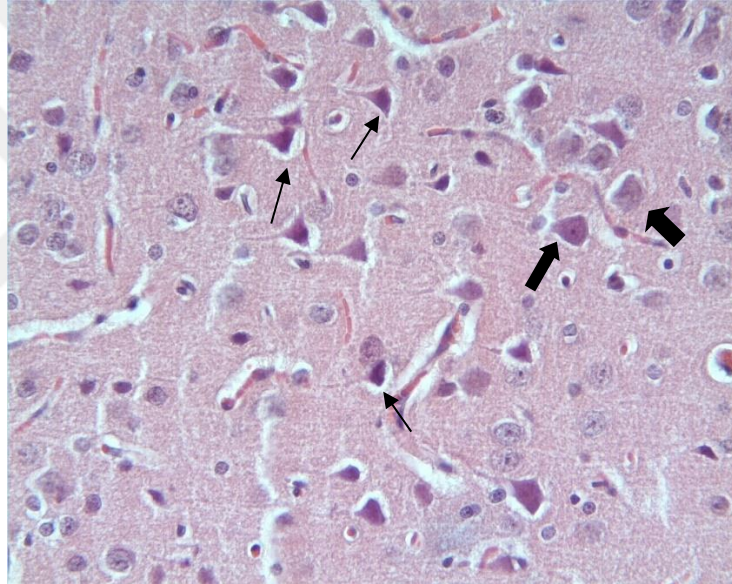
Şekil 4.20. I/R+CBO grubu. Hipokampüsde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.

Grup III (CBO+iskemi+reperfüzyon):

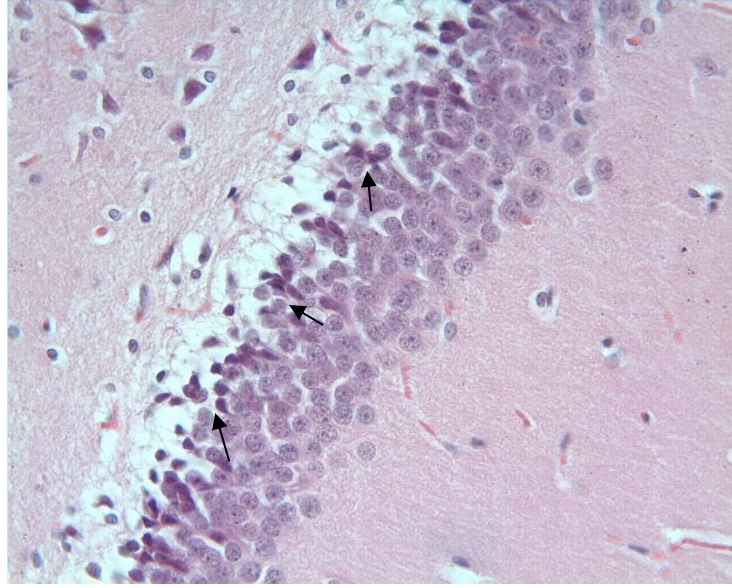
Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde dejenere nöronların sayısı bu grupta korteksde 3.84 ± 1.66 , hipokampüsde 2.21 ± 1.16 olarak tespit edildi (resim 4.21, resim 4.22). I/R grubu ile karşılaştırıldığında korteks ve hipokampüs bölgelerinde dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0.0001$).

Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde kaspas-3 (+) hücre sayısı korteks 2.98 ± 2.17 ve hipokampüste 3.40 ± 1.71 olarak tespit edildi. I/R grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının korteksde istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p < 0.0001$), hipokampüste ise anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.23, Şekil 4.24). I/R+CBO grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0.0001$).

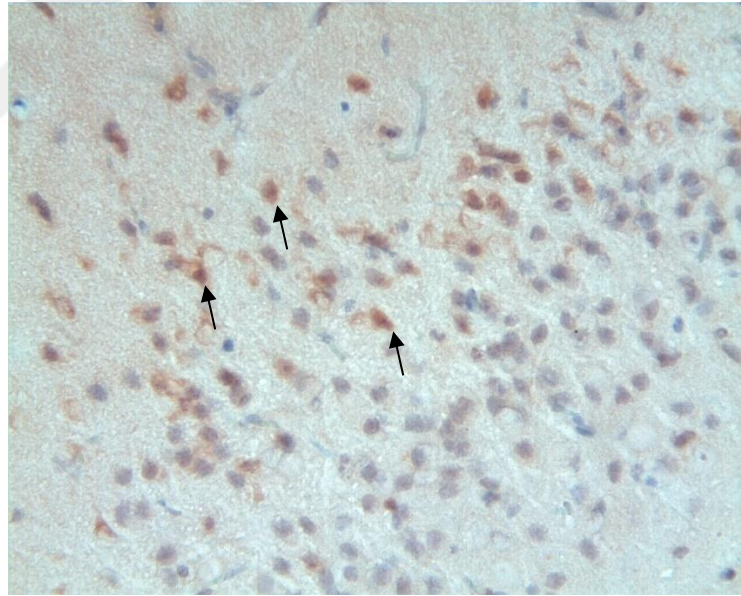
Bax boyama metodu uygulanan kesitlerde bax (+) hücre sayısı korteks 7.30 ± 1.85 ve hipokampüste 10.15 ± 2.95 olarak tespit edildi. I/R grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı izlendi ($p < 0.0001$) (Şekil 4.25, Şekil 4.26). I/R+CBO grubu ile karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak farkın olmadığı gözlemlendi ($p < 0.0001$).



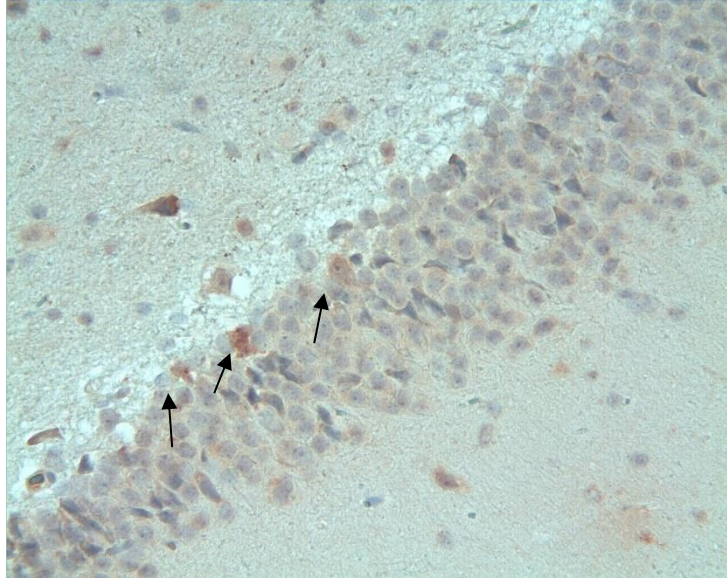
Şekil 4.21. CBO+I/R grubu. Sağlam nöronların arasında (kalın oklar) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



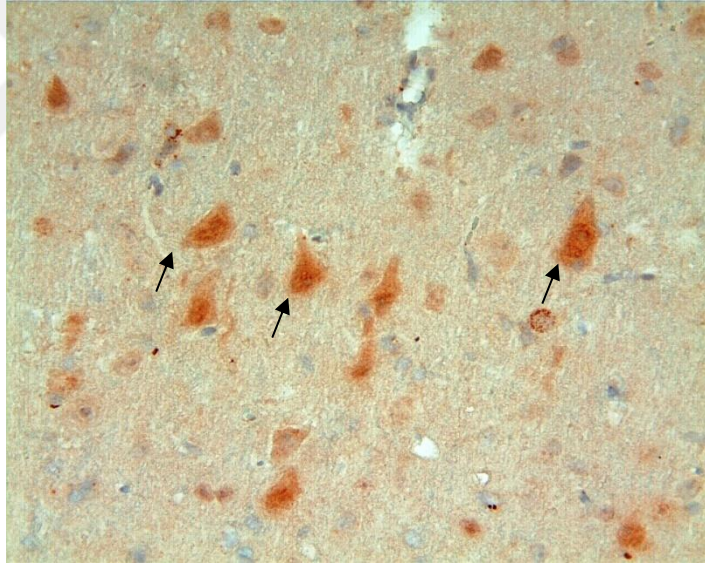
Şekil 4.22. CBO+I/R grubu. Hipokampusde sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X400.



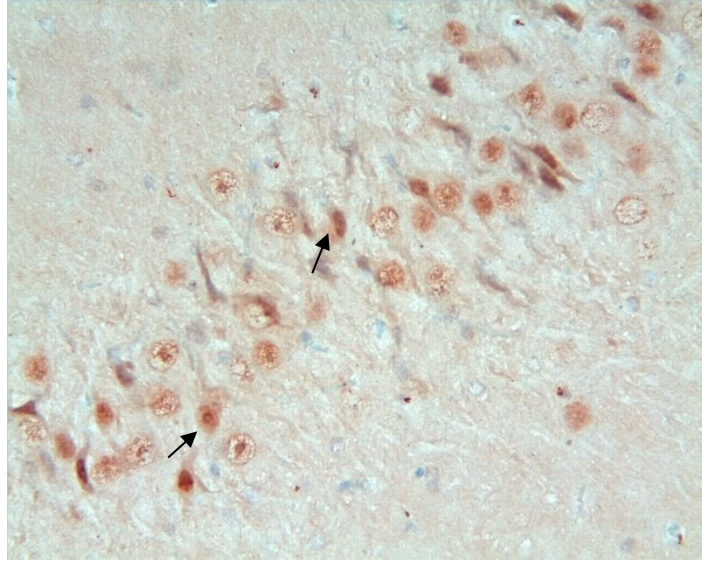
Şekil 4.23. CBO+I/R grubu. Korteksde kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar). Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.24. CBO+I/R grubu. Hipokampüste kaspaz 3 (+) hücreler izleniyor (oklar).
Kaspaz 3; X400.



Şekil 4.25. CBO+I/R grubu. Korteksde bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.



Şekil 4.26. CBO+I/R grubu. Hipokampüste bax (+) hücreler izleniyor (oklar). Bax; X400.

Tablo 4.3. Histopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Parametreler	Sham	I/R	I/R+CBO	CBO+I/R
Dejenere nöron sayısı (korteks)	0.14±0.35	6.24±0.22 ^a	2.61±1.56 ^b	3.84±1.66 ^{b,c}
Dejenere nöron sayısı (hipokampüs)	0.00±0.00	6.28±2.45 ^a	1.70±1.60 ^b	2.21±1.16 ^{b,c}
Caspase 3 (+) hücre sayısı (korteks)	0.17±0.37	7.04±2.04 ^a	1.38±1.27 ^b	2.98±2.17 ^{b,c}
Caspase 3(+) hücre sayısı (hipokampüs)	0.11±0.32	3.60±1.33 ^a	1.04±0.76 ^b	3.40±1.71 ^c
Bax (+) hücre sayısı (korteks)	0.20±0.40	9.67±2.95 ^a	6.90±2.87 ^b	7.30±1.85 ^b
Bax (+) hücre sayısı (hipokampüs)	0.04±0.20	11.95±3.75 ^a	9.42±1.62 ^b	10.15±2.95 ^b

^aKontrol ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.0001$)

^bI/R ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.0001$)

^cI/R+CBO ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.0001$)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Gruplardaki tüm ratlardan sakrifiye edilmeden önce solid organ hasarını değerlendirmek amacıyla alınan kan örneklerinde BUN, kreatinin, albumin, AST, ALT düzeyleri karşılaştırıldı.

Serum BUN, kreatinin, albümin, AST, ALT düzeylerinin karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Bulgular tablo 4.4'te gösterildi.

Tablo 4.4. Grupların Serum Biyokimyasal Bulguların Karşılaştırılması

	CBO Grubu (n:8)	I/R Grubu (n:12)	CBO+I/R Grubu (n:12)	I/R+CBO Grubu (n:12)	p değeri*
Kan üre azotu (mg/dL)	19.0 (17.2-26.6)	21.1 (16.8-26.2)	20.9 (12.0-29.8)	23.1 (19.5-28.7)	0.103
Kreatinin (mg/dL)	0.58 (0.53-0.72)	0.56 (0.54-0.62)	0.58 (0.53-0.61)	0.59 (0.53-0.64)	0.285
Albumin (g/dL)	1.10 (1.00-1.20)	1.25 (1.00-1.50)	1.20 (1.00-1.40)	1.20 (1.10-1.40)	0.139
Aspartat Aminotransferaz (IU/L)	149 (110-260)	124.5 (94-163)	160.5 (90-216)	141 (1130-187)	0.456
Alanin aminotransferaz (IU/L)	43.5 (33-100)	44(33-62)	46 (28-52)	54.5 (33-67)	0.563

4.3.1. Cinnamon Bark Oil'in Antioksidan Etkileri

CBO'nun antioksidan etkilerini değerlendirmek için sakrifikasyon işleminden sonra alınan beyin dokusunda grupların MDA, SOD, tGSH, TAK, TOK düzeyleri ve OSI değerleri karşılaştırıldı. Bulgular tablo 4.4 ve tablo 4.5'te gösterildi.

a) MDA düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile CBO+I/R, CBO+IR ile IR, IR+CBO ile IR, CBO ile I/R+CBO ve CBO+I/R ile I/R+CBO grupları arasında MDA düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

CBO+IR grubundaki MDA düzeyi CBO grubundaki MDA düzeyinden daha düşüktü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). İR+CBO grubundaki MDA düzeyi CBO grubundaki MDA düzeyinden daha düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). I/R+CBO grubundaki MDA düzeyi CBO+I/R grubundaki MDA düzeyinden daha düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

CBO+I/R grubundaki MDA düzeyi I/R grubundaki MDA düzeyinden daha düşüktü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$).

I/R+CBO grubundaki MDA düzeyinin I/R grubundaki MDA düzeyinden anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

b) SOD enzim aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile CBO+I/R ve I/R ile CBO+I/R grupları SOD düzeyleri açısından anlamlı bir şekilde birbirlerinden farklı olduğu saptandı ($p<0.05$).

CBO+IR grubundaki SOD düzeyi CBO grubundaki SOD düzeyinden daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). CBO+IR grubundaki SOD düzeyi IR grubundaki SOD düzeyinden anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.05$). Buna karşılık I/R+CBO ile CBO, IR+CBO ile IR ve I/R+CBO ile CBO+I/R grupları arasında SOD düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0.05$).

c) tGSH düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile CBO+I/R, CBO ile I/R+CBO, I/R ile CBO+I/R, I/R ile I/R+CBO, CBO+I/R ile I/R+CBO grupları tGSH düzeyleri açısından anlamlı bir şekilde birbirlerinden farklı olduğu saptandı ($p<0.05$).

CBO grubundaki tGSH düzeyi CBO+IR grubundaki tGSH düzeyinden anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p<0.05$). CBO grubundaki tGSH düzeyi IR+CBO grubundaki tGSH düzeyinden daha yüksekti ve bu farkın anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$). IR grubundaki tGSH düzeyi CBO+IR grubundaki tGSH düzeyinden anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p<0.05$). I/R grubundaki tGSH düzeyi IR+CBO grubundaki tGSH düzeyinden ve CBO+I/R grubundaki tGSH düzeyi IR+CBO grubundaki tGSH düzeyinden daha yüksekti ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

d) TAK düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile CBO+I/R, I/R ile CBO+I/R, I/R ile I/R+CBO ve CBO+I/R ile I/R+CBO grupları TAK düzeyleri açısından anlamlı bir şekilde birbirlerinden farklı olduğu saptandı ($p<0.05$).

CBO+I/R grubundaki TAK düzeyi CBO grubundaki TAK düzeyinden, CBO+I/R grubundaki TAK düzeyi I/R grubundaki TAK düzeyinden ve I/R+CBO grubundaki TAK düzeyi I/R grubundaki TAK düzeyinden daha yüksekti ve aradaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). Ayrıca CBO+I/R grubundaki TAK düzeyi I/R+CBO grubundaki TAK düzeyinden anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p<0.05$).

d) TOK düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile I/R, CBO ile CBO+I/R, CBO ile I/R+CBO, CBO+I/R ile I/R+CBO grupları arasında TOK düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

I/R grubundaki TOK düzeyi CBO grubundaki TOK düzeyinden, CBO+I/R grubundaki TOK düzeyi CBO grubundaki TOK düzeyinden, I/R+CBO grubundaki TOK

düzeyi CBO grubundaki TOK düzeyinden daha yüksekti ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

I/R+CBO grubundaki TOK düzeyi CBO+I/R grubundaki TOK düzeyinden daha düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

CBO+IR ile IR ve IR+CBO ile IR grupları arasında TOK düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

e) OSI değerlerinin karşılaştırılması

CBO ile I/R, CBO ile CBO+I/R, CBO ile I/R+CBO, I/R ile I/R+CBO grupları arasında OSI değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

I/R grubundaki OSI değeri CBO grubundaki OSI değerinden, CBO+I/R grubundaki OSI değeri CBO grubundaki OSI değerinden ve I/R+CBO grubundaki OSI değeri CBO grubundaki OSI değerinden daha yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). I/R+CBO grubundaki OSI değeri I/R grubundaki OSI değerinden istatistiksel olarak anlamlı düşüktü ($p<0.05$).

CBO+IR ile IR ve I/R+CBO ile CBO+I/R grupları arasında OSI değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

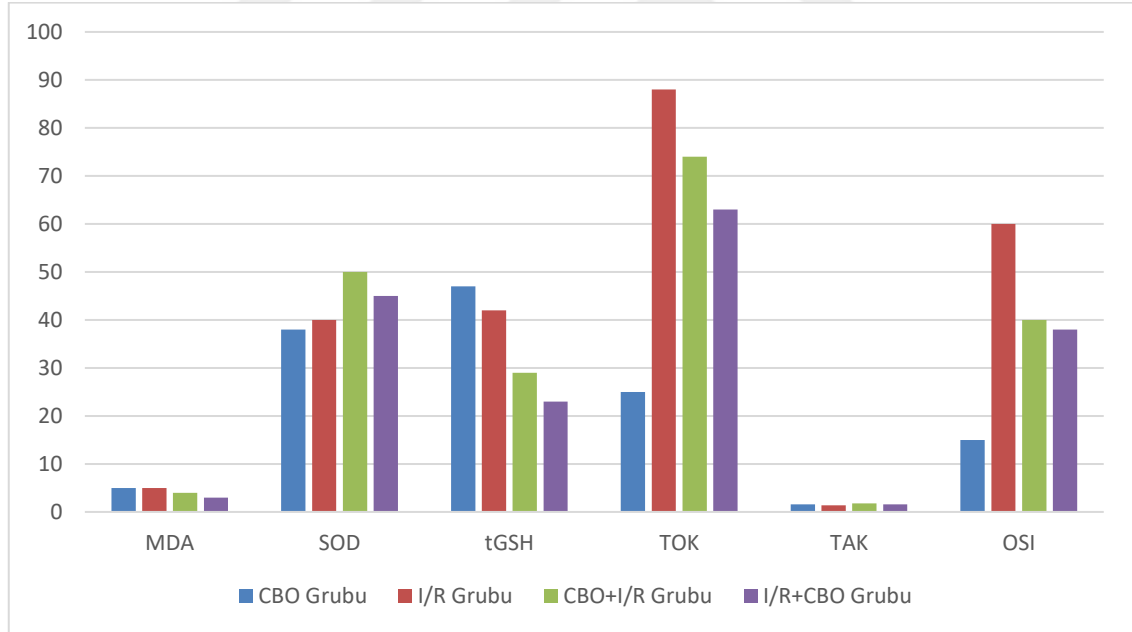
Tablo 4.5. Beyin Dokusu İnflamatuvar Parametrelerinin Düzeylerinin Karşılaştırılması

	CBO Grubu (n:8)	I/R Grubu (n:12)	CBO+I/R Grubu (n:12)	I/R+CBO Grubu (n:12)	p değeri
Malondialdehit (nmol/mg protein)	5.21 (5.14-5.72)	5.46 ^{b,c} (5.02-6.64)	4.00 ^{a,c} (3.35-4.51)	3.26 ^a (2.87-3.70)	0.001
Süperoksit Dismutaz (U/mg protein)	38.9 (22.7-54.6)	40.4 ^b (31.1-49.3)	50.9 ^a (46.5-76.5)	45.5 (39.7-52.2)	0.004
Total Glutasyon (nmol/mg protein)	47.3 (36.9-51.6)	42.6 ^{b,c} (27.2-47.5)	29.3 ^{a,c} (25.5-36.8)	23.7 ^a (18.7-30.6)	0.001
Total Oksidan Kapasite (mikromol H₂O₂ eşdeğer/L)	25.4 (22.6-39.5)	88.7 ^{a,c} (57.9-117.0)	74.7 ^{a,c} (55.1-119.1)	63.4 ^a (40.5-76.7)	0.001
Total Antioksidan Kapasite (mmol trolox eşdeğer/L)	1.66 (1.51-1.91)	1.49 ^{a,b,c} (1.39-1.64)	1.86 ^c (1.64-1.94)	1.60 (1.49-1.67)	0.001
Oksidatif Stres İndeksi	15.1 (11.8-23.7)	60.5 ^{a,c} (38.9-81.7)	40.1 ^a (31.9-65.7)	38.9 ^a (25.7-51.4)	0.001

a: CBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

b: CBO+I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

c: I/R+CBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

**Şekil 4.27.** Grupların Antioksidan Parametrelerinin Grafiksel Olarak Karşılaştırılması

(MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz, tGSH: Total glutasyon, TOK: Total oksidan kapasite, TAK: Total antioksidan kapasite, OSI: Oksidatif stres indeksi)

Tablo 4.6. Grupların Antioksidan Parametreler Bakımından Karşılaştırılması

<i>p</i> değeri	<i>p</i> 1 vs 2	<i>p</i> 1 vs 3	<i>p</i> 1 vs 4	<i>p</i> 2 vs 3	<i>p</i> 2 vs 4	<i>p</i> 3 vs 4
Malondialdehit (nmol/mg protein)	0.140	0.001	0.001	0.001	0.001	0.005
Süperoksit Dismutaz (U/mg protein)	0.674	0.006	0.074	0.002	0.093	0.093
Total Glutasyon(nmol/mg protein)	0.115	0.001	0.001	0.009	0.002	0.012
Total Oksidan Kapasite (mikromol H ₂ O ₂ eşdeğer/L)	0.001	0.001	0.001	0.294	0.013	0.036
Total Antioksidan Kapasite (mmol trolox eşdeğer/L)	0.005	0.074	0.156	0.001	0.046	0.002
Oksidatif Stres İndeksi	0.001	0.001	0.001	0.140	0.016	0.344

4.3.2. Cinnamon Bark Oil'in Anti-inflamatuar Etkileri

CBO'nun anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek için sakrifikasyon işleminden sonra alınan beyin dokusunda grupların MPO enzimi, IL-1 ve TNF- α düzeyleri karşılaştırıldı (tablo 4.7 ve 4.8).

a) MPO enzim düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile CBO+I/R, CBO ile IR+CBO ve I/R ile CBO+I/R grupları arasında MPO düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

CBO+I/R grubundaki MPO düzeyi CBO grubundaki MPO düzeyinden, IR+CBO grubundaki MPO düzeyi CBO grubundaki MPO düzeyinden ve CBO+I/R grubundaki MPO düzeyi I/R grubundaki MPO düzeyinden daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Fakat I/R+CBO ile I/R ve I/R+CBO ile CBO+I/R grupları arasında MPO düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

b) IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar IL-1 düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi ($p>0.05$).

c) TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması

CBO ile I/R, I/R ile CBO+I/R ve I/R ile IR+CBO grupları arasında TNF- α düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

I/R grubundaki TNF- α düzeyi CBO grubundaki TNF- α düzeyinden, I/R grubundaki TNF- α düzeyi CBO+I/R grubundaki TNF- α düzeyinden ve I/R grubundaki TNF- α düzeyi I/R+CBO grubundaki TNF- α düzeyinden daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Buna karşılık CBO+IR ile CBO, IR+CBO ile CBO ve IR+CBO ile CBO+IR grupları arasında TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0.05$).

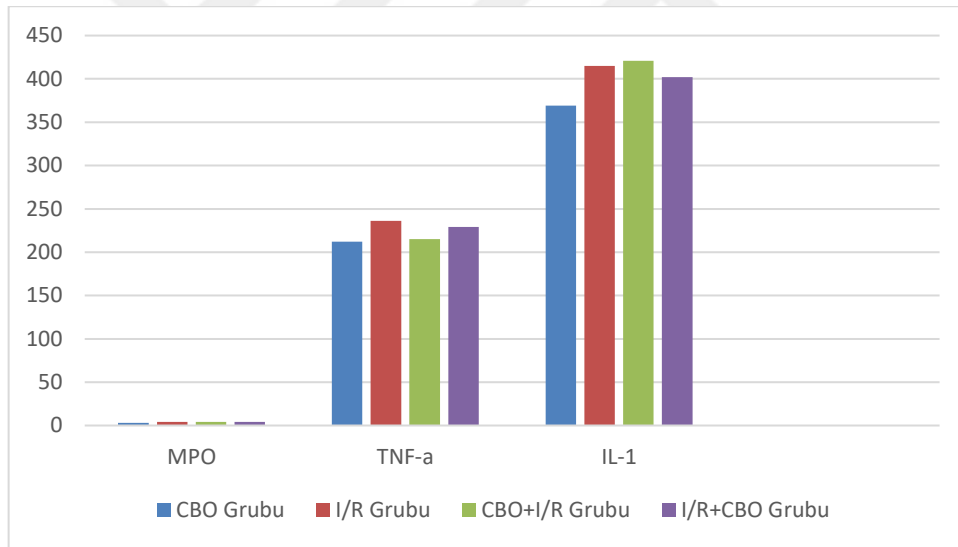
Tablo 4.7. Beyin Dokusu İnflamatuar Parametrelerinin Düzeylerinin Karşılaştırılması

	CBO Grubu (n:8)	I/R Grubu (n:12)	CBO+I/R Grubu (n:12)	I/R+CBO Grubu (n:12)	<i>p</i> değeri
Myeloperoksidaz (nmol/g yaş doku)	3.73 (3.41-4.22)	4.14 ^b (3.47-6.12)	4.85 ^a (4.11-5.84)	4.73 ^a (3.56-6.59)	0.004
Tümör nekroz faktörü- α (ng/L)	212.3 (205.7-236.1)	236.7 ^{a,b,c} (230.4-290.6)	215.5 (197.2-236.4)	229.9 (207.8-241.3)	0.005
İnterlökin-1 (ng/L)	369.9 (325.5-427.8)	415.6 (356.9-505.3)	421.6 (334.2-481.5)	402.3 (366.1-464.1)	0.102

a: CBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

b: CBO+I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

c: I/R+CBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.28. Grupların İnflamatuar Parametrelerinin Grafiksel Olarak Karşılaştırılması

(MPO: Miyeloperoksidaz, TNF-a: Tümör nekroz faktörü-a, IL-1: İnterlökin-1)

Tablo 4.8. Grupların İnflamatuar Parametreler Bakımından Karşılaştırılması

<i>p</i> değeri	<i>p</i> 1 vs 2	<i>p</i> 1 vs 3	<i>p</i> 1 vs 4	<i>p</i> 2 vs 3	<i>p</i> 2 vs 4	<i>p</i> 3 vs 4
Myeloperoksidaz (nmol/g yaş doku)	0.141	0.001	0.012	0.027	0.115	0.916
Tümör nekroz faktörü- α (ng/L)	0.011	0.674	0.091	0.006	0.015	0.073

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde son dekatlarda, iskemik inmede akut dönemde uygulanan reperfüzyona yönelik tedaviler, bu hastaların inme üniteleri veya nörolojik yoğun bakım koşullarında izlenmelerinin prognoz üzerinde gösterilmiş olumlu etkilerinin yanı sıra vasküler risk faktörlerinin kontrolü ve ortadan kaldırılması esasına dayalı, ön planda “koruyucu” olan tedavi yaklaşımlarının önemine dair farkındalığın artması sayesinde anlamlı ilerlemeler kaydedilmiştir.

İnme ile ilgili bu olumlu gelişmeler özellikle gelişmiş ülkelerde inme insidans ve ölüm oranlarında görülen azalmayla karşılık bulmuştur. Fakat gelişmekte olan ülkelerde inme insidans ve ölüm oranlarında anlamlı bir değişiklik görülmediği gibi mutlak sayı göz önüne alındığında tersine inmeli hasta, ölüm sayısı ve inmeye bağlı DALY sayısında artış olduğu ve gelişmiş ülkelere göre inme yaşının ortalama 3-5 yıl daha erken görülmeye başladığı bildirilmiştir (20, 182-184).

İnmeyle ilgili son 25-30 yıllık verileri değerlendiren epidemiyolojik çalışmalarda başlıca yaşam tarzıyla ilişkili (kötü beslenme, fiziksel inaktivite, sigara kullanımı vs.) metabolik hastalıklarda görülen artışla orantılı olarak 20-64 yaş grubunda inme prevalansı, yeni inmeli hasta, ölüm ve DALY kaybı mutlak sayılarında anlamlı artış olduğu saptanmıştır (1, 182, 185).

Bütün olarak ele alındığında bu epidemiyolojik çalışmaların verileri inme yükünün tüm dünyada ve özellikle gelişmekte olan ülkelere giderek arttığını göstermektedir (182-184, 186, 187). Buna ilaveten bu çalışmalar, inmede değiştirilemeyen risk faktörlerinden biri olan yaş ve “yaş arttıkça inme riski de artar” şeklindeki klasik bilgiye artık inmenin genç yaş grubundaki populasyon için de önemli ve sıklığı giderek artan bir hastalık haline geldiği bilgisini de eklemektedir. Buna rağmen güncel olarak iskemik inmenin akut döneminde reperfüzyonu hedefleyen kısa bir zaman aralığıyla sınırlı, sadece uygun koşulları sağlayan hastalara uygulanabilen İV trombolitik tedavi ve mekanik trombektomi dışında bir tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır (2, 3, 188).

Bugün için akut inmede altın standart kabul edilen bu tedaviler aynı zamanda iskemik dokuda rekanalizasyon sonrası reperfüzyona bağlı I/R hasarının bir nedeni olabilmektedir (4, 55, 106). Bu durum akut inmede iskemik dokuda spontan gelişebilen yada bu rekanalizasyon tedavileriyle ilişkili I/R hasarı engellemeye/azaltmaya yönelik

yapılan klinik araştırmalar ve deneysel hayvan modellerinde diğerk potansiyel tedavilerin geliştirilmesini gündeme getirmektedir. Nöroprotektif tedavi; iskemi sonucu ortaya çıkan hücresel, biyokimyasal ve metabolik hasarı engellemeye yönelik bir tedavidir. Reperfüzyon tedavilerinde olduğu gibi nöroprotektif tedavilerde de amaç iskemik çekirdeğin genişlemesini önleyerek iskemik penumbranın kurtarılmasıdır. İskemi sonrası ve I/R hasarının n ropatogenez sürecinde rol oynayan moleküler ve hücresel düzeydeki mekanizmaların giderek daha net olarak tanımlanmasıyla bu kaskadın her aşamasını hedefleyen ilaçların geliştirilmesi gündeme gelmeye başlamıştır.

Literatürde iskemik inme ile ilgili gen terapisi dahil çok fazla sayıda ilaç, molekül ve nutras tiklerle yapılmış pre-klinik çalışmalarda bu tedavilerin protektif etkili olabilecekleri gösterilmiş olsa da, İV trombolitik tedavi ve mekanik trombektomi dışında günümüzde bu tedaviler klinik uygulamalara başarılı bir şekilde yansıtılamamıştır (5).

Deneysel I/R modelleri farklı tekniklerle global ve fokal iskemi modelleri şeklinde oluşturulabilmektedir. Global serebral iskemi modeli; iki taraflı CCA oklüzyonu, tek taraflı 24 saatlik CCA oklüzyonu, 4 arter oklüzyonu (iki yanlı CCA+2 yanlı VA'ler), BOS basıncını arttırarak, turnike ve dekapitasyon yöntemleriyle oluşturulabilmektedir (189). Çalışmada kullanılan iki yanlı CCA'ların oklüde edilmesi ile oluşturulan global iskemi modeli insanlarda kardiyak arrest sonrası gelişen asfiksiye karşılık gelen bir modeldir (99). Bu modelde anterior sirkülasyon sisteminde şiddetli iskemi oluşturulabilmesi, kronik sağkalım çalışmaları için uygun olması ve mortalitenin az görülmesi tercih nedenidir (189).

Literatürdeki az sayıdaki çalışmada tarçın (C.verum) kabuğundan elde edilen bir esansiyel yağ olan CBO, majör bileşiği olan sinnemaldehit ve tarçının içeriğindeki diğerk bileşiklerin, farklı deneysel iskemi veya I/R modellerinde glutamat eksitotokisitesini azaltıcı oksidatif strese karşı, antioksidan, anti-inflamatuar özellikte, nöroprotektif ve apoptozdan koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (11-15, 139). CBO'nun literatürde ortaya konmuş etkilerinden yola çıkararak bu deneysel global I/R modeli çalışmasında CBO'nun olası antioksidan, anti-inflamatuar, antiapoptotik ve nöroprotektif etkileri araştırıldı. Çalışmada oluşturulan sham sadece CBO alan ve kontrol olarak oluşturulan grubu, grup II sadece I/R hasarı olan, grup III CBO'nun I/R  ncesi proflaktik olarak verildiği grubu ve grup IV I/R sonrası tedavi amaçlı CBO kullanan grubu ifade etmektedir.

Cinnamon bark oil'in antiapoptotik etkisi

Bu deneysel çalışmada alınan beyin doku örneklerinde kontrol grubunun H-E boyama sonrası yapılan değerlendirmede dokunun histolojik olarak normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). İskemi grubuna ait beyin doku örneklerinde serebral korteks ve hipokampüste nöronal dejenerasyonla uyumlu ve belirgin histopatolojik değişiklikler olduğu izlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.10). İskemi grubundaki korteks ve hipokampüsteki dejenere nöron sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığı tespit edildi.

Deneysel iskemi modelinde kullanılan ratın cinsi, yaşı ve I/R süresi iskemiye karşı oluşan yanıtı etkilemektedir. İki yanlı CCA oklüzyonu ile oluşturulan global I/R sonrası korteks, hipokampus ve striatum hipoksiden en çok etkilenen bölgelerdir (174).

CBO uygulamasının, I/R öncesi profilaktik olarak verildiği grupta oluşan histopatolojik hasarı hem korteks hemde hipokampal bölgede azalttığı, iskemiye bağlı olumsuz etkileri anlamlı derecede giderdiği saptandı (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Benzer şekilde CBO'nun I/R sonrası tedavi amaçlı verildiği grupta da korteks ve hipokampüste nöronal dejenerasyonu anlamlı derecede azalttığı izlendi (Şekil 4.15, Şekil 4.16).

İskemi veya I/R hasarı sonrası görülen hücre ölümünde apoptoz önemli bir mekanizmadır. Deney gruplarında apoptoza giden hücreleri gözlemlemek amacıyla IHC boyamada; BCL-2 ailesi üyesi pro-apoptotik proteinlerden olan Bax ve kaspaz-3 aracılı (ve nekroptozun son aşamasında) apoptozda kritik öneme sahip kaspaz-3 aktivitesi için immün boyama prosedürü uygulandı. İskemi grubuna ait doku örneklerinde beklendiği gibi hem kaspaz-3 hem Bax IHC boyama sonrası apoptoza giden hücre sayısının anlamlı derecede arttığı saptandı. (Şekil 4.11, 4.12 ve Şekil 4.13, 4.14).

CBO'nun profilaktik verildiği grupta başlıca kortekste nöronlarda kaspaz aktivitesine bağlı apoptozu anlamlı bir şekilde azalttığı buna karşılık hipokampal bölgedeki apoptoz üzerine anlamlı bir etki göstermediği tespit edildi. Bu grupta CBO'nun Bax aktivitesine bağlı apoptozu hem korteks hem hipokampüste anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı (Şekil 4.23, 4.24 ve Şekil 4.25, 4.26).

CBO'nun tedavi amaçlı verildiği grupta kaspaz-3 ve Bax aktivitesine bağlı apoptozu korteks ve hipokampal bölgede iskemik gruba göre anlamlı azalttığı tespit edildi (Şekil 4.17, 4.18 ve Şekil 4.19, 4.20).

CBO uygulamasının kaspaz-3 ve Bax aktivitesine bağı kortikal ve hipokampal apoptotik hücre ölümü üzerine profilaktik olarak verilmesi veya tedavide kullanılması arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Histopatolojik incelemelerin tüm verileri birlikte değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar;

- CBO'nun hem profilaktik hemde nöroprotektif etki anlamına da gelen tedavide kullanımının I/R hasarını azalttığı ve iskemiye bağı olumsuz etkileri anlamlı derecede giderdiği,
- CBO'nun profilaktik olarak uygulanmasının I/R hasarında kaspaz-3 aktivitesine bağı apoptozdan başlıca kortikal nöronları, Bax aktivitesine bağı apoptozdan hem kortikal hemde hipokampal nöronları anlamlı bir şekilde koruduğı,
- CBO'nun I/R hasarı sonrası nöroprotektif etkili olduğı, bu etkisini nöronal ve hipokampal nöronlarda kaspaz-3 ve Bax aktivitesine bağı apoptozu anlamlı bir şekilde azaltarak gösterdiği,
- CBO uygulanmasının profilaktik olarak verilmesiyle I/R hasarı sonrası verilmesinin iskemiye bağı apoptozdan korumada anlamlı bir farkı olmadığını göstermektedir.

İskemik dokuda CBO'nun antiapoptotik etkili olduğı literatürde çok az sayıdaki çalışmada gösterilmiştir. Apoptoz genetik olarak programlanmış bir çeşit hücre ölümüdür. BCL-2 ailesi üyesi proapoptotik proteinlerinden olan Bax ve BAK mitokondri dış membranında yerleşik ve apoptoz sürecini başlatan proteinlerdir. Bu proteinler ayrıca endoplazmik retikulumda bulunur ve kalsiyum dengesini düzenler (190). Kaspaz-3 aktivitesinin artışı apoptoz için bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Kaspaz ailesi üyeleri içinde apoptozda en kritik role sahip olan kaspaz-3 aktivasyonu DNA hasarı ve hücrenin iskeletini bozarak ölümüne yol açmaktadır (190).

CBO'nun içeriğinde başlıca bileşik olan sinnamaldehitin bir metaboliti olan sodyum benzoatın, global iskemi oluşturulmuş rat modelinde sitokrom c, kaspaz-3 salınımını ve Bax/BCL-2 oranını azaltarak apoptozdan koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Buna ek olarak sodyum benzoat, fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda hücrenin proliferasyonu, canlılığını koruması ve metabolizması için yaşamsal öneme

sahip phosphatidylinositol-3 kinase/Akt (PI3K/p-Akt) sinyal yolunun aktivitesini arttırarak da hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (190) PI3 K/p-Akt sinyal yolu antiapoptotik proteinlerin salınımını artırırken proapoptotik proteinlerin salınımını azaltan bir sinyal yolağıdır (12). PI3 K/p-Akt sinyal yolunun inhibisyonu hücre metabolizma hızını yavaşlatmaktadır (190). Ayrıca PI3 K/p-Akt sinyal yolunun aktivasyonu apoptozun başlamasını inhibe etmektedir. Bu etkisini kaspaz-9 aktivasyonunu ve Fas reseptörleri aracılı apoptozis yolunu inhibe ederek göstermektedir (190).

Sinnamaldehydin yağda eriyebilen özellikte olduğu için KBB'ni kolayca geçebilen bir formu olan trans-sinnamaldehytin deneysel I/R modelinde intrasellüler ROS üretimini azalttığı, apoptozda önemli rol oynayan mitokondrilerde membran potansiyellerini düzelterek ayrıca PI3 K/Akt sinyal yolunu aktive ederek apoptoz oranını azalttığı ve I/R hasarında nöroprotektif etkili olduğu bulunmuştur (12).

Cinnamon bark oil'in antioksidan etkisi

İskemi sonrası ve I/R hasarında oksidatif stres ve inflamasyon ana rol oynamaktadır. CBO'nun oksidatif stresle ilişkili antioksidan ve oksidan parametler üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla gruplardaki tüm ratlardan alınan beyin doku örneklerinden SOD, tGSH, MDA, TAK, TOK düzeyleri ve OSİ değerleri karşılaştırıldı. CBO'nun proflaktik verildiği grupta SOD düzeyi kontrol grubuna ve iskemi oluşturulan gruba göre anlamlı yüksekti. Kontrol grubunda tGSH düzeyi hem proflaksi verilen hem de tedavi edilen gruba göre anlamlı yüksekti. Bu sonuç her iki grupta I/R hasarının bir sonucu olarak tGSH düzeyinin zaten düşeceğini ve CBO'nun bu gruplarda her hangi anlamlı bir etkide bulunmadığını gösteriyor olsa da paradoksal olarak tGSH düzeyleri iskemi oluşturulan grupta proflaksi verilen ve tedavi uygulanan gruba göre de anlamlı yüksekti. Ayrıca tGSH düzeylerinin proflaktik grupta tedavi edilen gruba göre anlamlı yüksek olduğu tespit edildi.

Serebral I/R hasarına bağlı pek çok antioksidan sistemde ciddi hasar oluşmaktadır ve beyin dokusu hasarı arttıran fazla ROS üretimine hasas hale gelmektedir (160). Oksidatif stres durumunda ROS veya RNS'nin fazla arttığı durumlarda GSH sentezlenmesi inhibe olabilmektedir. İskemi sonrası dokuda reperfüzyon olsun veya olmasın serebral iskemi süresince ROS/RNS'in çok fazla üretimi sonucu ya ROS'a bağlı

hasarın detoksifikasyonunda rol oynayan antioksidan mekanizmalar yetersiz kalır yada antioksidanlar tükenir (158, 160).

Çalışmadan elde edilen tGSH ile ilgili bulgular CBO'nun profilaktik veya tedavi amaçlı verildiğinde iskemik gruba karşı başlıca bir yarar sağlamadığı, bu paradoksal bulgunun başlıca deneyde kullanılan global I/R modeline bağlı şiddetli iskemik hasarın sonucu olduğu düşünüldü. Ayrıca profilaksi ve tedavi grupları kendi içinde karşılaştırıldığında CBO'nun profilaktik olarak uygulanmasının tGSH düzeyini artırarak I/R hasarından sonra tedavide uygulanmasına göre daha anlamlı bir yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir. İskemik gruba göre profilaksi ve tedavi edilen grupta tGSH'ın daha düşük bulunması paradoksal bir bulgudur ve her ne kadar çalışmada kullanılan rat gruplarının homojen özellikte olmasına dikkat edilmiş olsa da deneklerin oksidatif strese verdikleri bireysel yanıtın farklı olmasıyla ilişkili olabileceği düşünüldü.

Hücre lipidlerinin peroksidasyonunun ana metaboliti olan MDA'nın artmış düzeyi oksidatif stres için iyi bir göstergedir. CBO uygulamasının hem profilaksi hemde tedavi grubunda kontrol grubuna göre MDA düzeyini düşürdüğü ayrıca iskemik grupla karşılaştırıldığında da bu gruplarda MDA düzeyini anlamlı bir şekilde düşürdüğü saptandı. Buna ek olarak, MDA düzeylerinin tedavi edilen grupta profilaksi grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu saptandı. Bu bulgular CBO'nun I/R hasarında hem profilaktik hemde tedavide anlamlı bir şekilde hücrelerde lipid peroksidasyonunu azaltabileceği ve CBO tedavide kullanıldığı takdirde bu etkinin profilaktik verilmesine göre daha da anlamlı nöroprotektif etkili olabileceğini düşündürmektedir.

CBO uygulaması hem profilaksi hem tedavi grubunda kontrol grubuna göre TAK düzeyini anlamlı bir şekilde arttırmıştı. İskemi grubuyla karşılaştırıldığında da hem profilaksi hem tedavi grubunda TAK düzeyi daha yüksekti. Ayrıca TAK düzeyi CBO verilen profilaksi grubunda tedavi grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksekti.

CBO uygulamasının I/R hasarında TAK düzeyi artırırken CBO'nun olumlu bir etkisi olarak TOK düzeyini de düşürmesi beklenir. Buna karşılık, TOK düzeyi ve OSİ değeri iskemi, profilaksi ve tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti. Bu bulgu, CBO uygulamasının TOK düzeyine anlamlı bir etkide bulunmadığını göstermekle birlikte TOK düzeyi tedavi edilen grupta profilaksi grubuna göre daha düşüktü. Ayrıca OSİ değeri CBO ile tedavi edilen grupta iskemik gruba göre anlamlı bir şekilde düşük iken profilaksi grubunun OSİ değeri ile iskemik grup OSI değeri arasında fark yoktu.

TAK, TOK ve OSİ ile ilgili bulgular birlikte değerlendirildiğinde; CBO'nun hem profilaksi hem tedavi grubunda anlamlı bir şekilde TAK düzeyini arttırarak iskemiye karşı olumlu etki göstererebileceği ve bu etkinin profilaksi olarak verildiğinde daha anlamlı olabileceğini buna ilaveten TOK düzeylerini başlıca tedavi grubunda düşürerek antioksidan etkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde sinmalaldehytin TAK ve TOK düzeylerine olan etkisini değerlendiren çalışma bulunamadığından bu sonuçları karşılaştırmak mümkün olmadı.

Oksidatif stresle ilişkili tüm bu parametrelerin bulguları, CBO'nun I/R hasarında hem profilaktik olarak hem de tedavide bazı antioksidan etkilerinin olduğunu göstermektedir. C.verum tarçının pek çok ekstraktının oldukça güçlü serbest radikal temizleyici ve antioksidan özellikte olduğu gösterilmiştir (191). CBO'nun ratlarda 75 mg/kg dozunda 4 hafta süre ile kullanımı SOD, katalaz ve glukoz oksidaz aktivitesini arttırarak ROS'un detoksifikasyonunu arttırarak, lipid peroksidasyon düzeylerini ve apoptotik indeksi azaltarak antioksidan etki göstermektedir (191). Ayrıca sinmalaldehyt; iNOS salınımını baskılayarak, glutatyon düzeyini arttırarak ve MDA üretimini inhibe ederek antioksidan aktivite göstermektedir (191). Tarçındaki fenolik ve flavonoid yapıdaki diğer bileşikler de güçlü antioksidan etki ve serbest radikal temizleyici ajanlardır (14, 191). CBO'daki sinmalaldehytle birlikte öjenol ve linalol gibi diğer bileşiklerde peroksinitritin indüklediği nitratif stres ve lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (191).

İskemik glial hücre kültürü ile oluşturulmuş deneysel modelde tarçının flavonoid sınıfından bir bileşiği olan A tipi prosiyanidin, benzer iskemik modelde yapılan diğer bir çalışmada da polifenol yapıdaki bileşiğin iskeminin indüklediği hücrelerde azalmış glutamat geri alımını düzelttiği ve eksitotokisiteden koruduğu, hücre içi artmış kalsiyumu azaltarak mitokondriyal depolarizasyonu düzelttiği, ROS/RNS düzeyini azaltarak antioksidan etki gösterdiği ve tüm bu etkilerin sonucu olarak bu tarçın bileşiklerinin antiödem etkili ve nöroprotektif olabileceği bildirilmektedir (11, 139).

Fare beyni endotel hücre kültürüyle oluşturulan iskemi modelinde, tarçındaki polifenol yapıdaki bileşikten elde edilen sinmantanin D1, iskemi sonucu bozulan mitokondriyal membran potansiyelini düzelterek mitokondrilerden serbest radikal salınımını azalmasına ve iskeminin erken döneminde görülen endotelial hücrelerdeki intrasellüler kalsiyumu azaltarak endotel hücrelerinde sitotoksik ödemin gelişimini önlemektedir. Ayrıca iskemi sonrası endotel ve makrofaj hücrelerinden salınan, monosit ve T hücrelerini dokuya çeken bir kemokin olan monosit kemoreaktan protein 1'in

(CCL2) dokuda birikimini inhibe etmektedir. Sonuç olarak polifenoller mitokondriyal ROS üretimini azaltarak endotelial hücrelerdeki sitotoksik ve daha sonraki aşamada serebral ödem ve bununla ilişkili nöronal hasarı azaltmaktadır (192).

Cinnamon bark oil'in anti-inflamatuar etkisi

CBO'nun inflammatuar yanıt üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla gruplardaki tüm ratlardan alınan beyin doku örneklerinden IL-1, TNF- α ve MPO enzim düzeyleri karşılaştırıldı. CBO'nun gruplarda IL-1 düzeyine etkisi olmadığı saptandı.

TNF- α iskemi grubunda kontrol grubuna göre yüksekti. CBO uygulanan hem profilaksi hemde tedavi grubunda TNF- α düzeyi iskemik gruba göre anlamlı olarak düşüktü.

MPO düzeyi profilaksi ve tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermişti. Bu sonuç her ne kadar I/R hasarı olan gruplarda MPO'nun kontrol grubundan daha yüksek olması beklenen bir sonuç ise de CBO'nun her iki grupta MPO enzim düzeyine anlamlı bir etkisinin olmadığını da göstermektedir. Fakat paradoksal bir bulgu olarak MPO düzeyi profilaksi grubunda iskemik gruba göre artmıştı. MPO enzimi başlıca aktive nötrofillerden salınan ve iskemik dokuda ek hasara yol açan ROS üretimini arttırarak inflamasyonda anahtar rol oynayan bir enzimdir. Nötrofil kaynaklı MPO aktivitesi iskemiyi izleyen 1-3 günler arasında pik yapmaktadır (170). Süperoksit anyonundan SOD enzimi aracılığıyla üretilen H₂O₂, düşük konsantrasyonda normal hücrel fonksiyonların homeostazisini korumada fizyolojik bir role sahipken yüksek miktarlar zararlı olabilmektedir (193). Bu çalışmada CBO uygulamasının profilaksi grubunda SOD enzim düzeyini arttırdığı göz önüne alınırsa I/R sonrası oksidatif strese kaynaklı artmış süperoksit düzeyi SOD ile üretilen H₂O₂ konsantrasyonunu belirgin artırarak paradoksal bir etki ile MPO enzim aktivitesini bu grupta arttırmış olma ihtimalini düşündürmüştür.

MCA oklüzyonu oluşturulan deneysel fare modelinde sinnamaldehitin infarkt volümünü, ödem etkisini ve nörolojik defisiti azaltan anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada sinnamaldehit iskemi oluşturulmadan 1 saat önce ve iskemiyi izleyen 4.saatte verilmiştir. Bu etkisini iskemi sonrası TLR-4, tümör nekroz reseptörle ilişkili faktör 6 (TRAF-6) ve NF- κ B gibi inflammatuar yanıtı başlatan ve/veya arttıran sinyal yollarıyla ilişkili moleküllerin aktivasyonlarını baskılayarak inflamasyonla birlikte artan TNF- α , IL-1 β , bir kemokin olan monosit kemoreaktan

protein 1 (CCL2) ve endotelyal-lökosit adhezyon molekülü-1 düzeylerini azaltarak göstermektedir. Bütün bu etkilerin sonucunda iskemik beyin dokusuna lökositlerin infiltrasyonu engelleyerek anti-inflamatuar etki göstermektedir (13).

Serebral I/R oluşturulmuş deneysel modelde CBO içeriğindeki trans-sinnamaldehitin iskemik dokuda nöroinflamasyonu baskılıyarak hem anti-inflamatuar hemde nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada trans-sinnamaldehitin infarkt alanının ve nörolojik defisit skorunu azalttığı saptanmıştır. Bu etkisini TNF- α , NO, iNOS, prostoglandin sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan COX-2 düzeylerini azaltarak, NF- κ B aktivasyonunu baskılıyarak ve p53 proteinini artırarak göstermektedir (15).

Sonuç olarak, histopatolojik ve biyokimyasal tüm veriler göz önüne alındığında bu çalışmada I/R hasarında CBO'nun profilaksi veya tedavi amaçlı kullanıldığında akut inflamatuvar parametreleri azalttığı buna karşılık antioksidan parametreleri arttırdığı saptandı. Ayrıca histolojik olarak korteks ve hipokampal nöron dejenerasyonunda azalma sağlayarak serebral doku hasarını sınırladığı, bu özelliği ile anti-apoptotik ve nöroprotektif etkili olduğu tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akut inmede, iskemik dokuda spontan olarak veya İV trombolitik tedavi, mekanik trombektomi gibi rekanalizasyon tedavilerine bağlı gelişen I/R hasar, nöropatogenezinde rol oynayan mekanizmalarla ilgili hala bilinmeyen çok olan ve kötü prognozla ilişkili bir durumdur.

Bu güne kadar I/R hasarının oluşmasını engellemeye veya oluşan hasarı azaltmaya yönelik potansiyel nöroprotektif etkili tedavilerin geliştirilmesi için yapılan pre-klinik araştırmalarda pek çok molekül ve ilacın etkili olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte insan beyinde gelişen iskemi veya I/R hasarının patofizyolojisinde rol oynayan glutamat eksitotoksitesi, oksidatif stres, inflamasyon, KBB'deki bozulma, mikrovasküler hasar, hemostazın bozulması, otofaji ve apoptoz gibi son derece kompleks mekanizmaların henüz tam olarak aydınlatılamamış olması ayrıca hayvan deney modellerinden elde edilen sonuçların insan beyinde gelişen iskemik nöropatogenetik süreçlerle bire bir uyuşmaması bu nöroprotektif/tedavi edici ilaç veya moleküllerin klinik pratik uygulamalara aktarılmasını engellemektedir.

Bu çalışmada, C.verum tarçını kabuğundan elde edilen bir esansiyel yağ olan CBO'nun deneysel global I/R modelinde beyin dokusunda profeksi veya tedavi amaçlı kullanıldığında antioksidan, anti-inflamatuvar etkili olabileceği ayrıca histopatolojik olarak korteks ve hipokampal bölgede doku hasarını sınırladığı, bu özelliği ile antiapoptotik ve nöroprotektif etkili olabileceği saptandı.

Binlerce yıldan beri doğadaki bitkilerden hastalıkların tedavisinde ilaç olarak yararlanmayı keşfeden insanoğlu için günümüzde bitkilerin hastalıklardan korunma veya tedavi amaçlı kullanılması daha da önem kazanmıştır. Bugün için altın standart kabul edilen İV trombolitik tedavi akut iskeminin ilk 4.5 saatinde, mekanik trombektomi uygun hastalarda maksimum 24 saat içinde uygulanabilen tedavilerdir. Halbuki tedavilerde hedef doku olan penumbra nöronların iskemiden sonra apoptoz/nekroptoz gidiş süreci saatler ve günler sonra olabilmektedir. Dar bir zaman aralığında uygulanması gereken bu tedavilere ek olarak I/R bağlı iskemik hasarın gelişmesini engelleyebilen veya gelişen hasarı sınırlayabilen nöroprotektif etkili bitkisel kökenli biyoaktif moleküllerin veya ilaçların bulunması, bunların nöropatogenezde rol oynayan mekanizmaların herhangi biri

zerinde olumlu bir etkisinin gösterilmesi bugün için erişkinlerde ölüm ve sakatlığın en önemli nedeni olan inmenin tedavisinde bir başarı ölçütü sayılmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(20).
2. Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams Jr HP. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2009; 40(8): 2945-8.
3. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018; 49(3): e46-e99.
4. Mandalaneni K, Rayi A, Jillella DV. Stroke Reperfusion Injury. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
5. Kim E, Cho S. CNS and peripheral immunity in cerebral ischemia: partition and interaction. *Experimental neurology*. 2021; 335: 113508.
6. Singh N, Rao AS, Nandal A, Kumar S, Yadav SS, Ganaie SA, et al. Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. *Food chemistry*. 2021; 338: 127773.
7. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*. 2015; 7(9): 7729-48.
8. Zhu C, Yan H, Zheng Y, Santos HO, Macit MS, Zhao K. Impact of Cinnamon supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary therapies in medicine*. 2020: 102517.
9. Singh N, Rao AS, Nandal A, Kumar S, Yadav SS, Ganaie SA, et al. Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. *Food chemistry*. 2021; 338: 127773.

10. Panickar KS, Polansky MM, Anderson RA. Cinnamon polyphenols attenuate cell swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in glial cells. *Experimental neurology*. 2009; 216(2): 420-7.
11. Panickar K, Polansky M, Graves D, Urban Jr J, Anderson R. A procyanidin type A trimer from cinnamon extract attenuates glial cell swelling and the reduction in glutamate uptake following ischemia-like injury in vitro. *Neuroscience*. 2012; 202: 87-98.
12. Qi X, Zhou R, Liu Y, Wang J, Zhang W-N, Tan H-R, et al. Trans-cinnamaldehyde protected PC12 cells against oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced injury via anti-apoptosis and anti-oxidative stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016; 421(1): 67-74.
13. Zhao J, Zhang X, Dong L, Wen Y, Zheng X, Zhang C, et al. Cinnamaldehyde inhibits inflammation and brain damage in a mouse model of permanent cerebral ischaemia. *British journal of pharmacology*. 2015; 172(20): 5009-23.
14. Ramazani E, YazdFazeli M, Emami SA, Mohtashami L, Javadi B, Asili J, et al. Protective effects of Cinnamomum verum, Cinnamomum cassia and cinnamaldehyde against 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells. *Molecular biology reports*. 2020; 47(4): 2437-45.
15. Chen Y-F, Wang Y-W, Huang W-S, Lee M-M, Wood WG, Leung Y-M, et al. Trans-cinnamaldehyde, an essential oil in cinnamon powder, ameliorates cerebral ischemia-induced brain injury via inhibition of neuroinflammation through attenuation of iNOS, COX-2 expression and NFκ-B signaling pathway. *Neuromolecular medicine*. 2016; 18(3): 322-33.
16. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; 44(7): 2064-89.
17. Özkaya E. İnmeli hastalarda algılanan sosyal destek ile fonksiyonel durum, yaşam kalitesi ve depresyon arasındaki ilişki: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Fiziksel Tıp ve ...; 2019.

18. Kablan Y. İnme: Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri Neurology-Special Topics*. 2018; 11(2): 1-19.
19. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018; 137(12): e67-e492.
20. Yang JL, Mukda S, Chen SD. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. *Redox biology*. 2018; 16: 263-75.
21. Pawluk H, Woźniak A, Grzešek G, Kołodziejska R, Kozakiewicz M, Kopkowska E, et al. The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Clinical interventions in aging*. 2020; 15: 469-84.
22. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2009; 111(6): 483-95.
23. İnme KY. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri Neurology-Special Topics*. 2018; 11(2): 1-19.
24. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MS. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res*. 2017; 120(3): 472-95.
25. Guzik A, Bushnell C. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017; 23(1, Cerebrovascular Disease): 15-39.
26. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet (London, England)*. 2010; 376(9735): 112-23.
27. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet (London, England)*. 2016; 388(10046): 761-75.
28. Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Neurology*. 2016; 15(9): 913-24.

29. Kuklina EV, Tong X, George MG, Bansil P. Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective. *Expert review of neurotherapeutics*. 2012; 12(2): 199-208.
30. Perkovic V, Rodgers A. Redefining Blood-Pressure Targets--SPRINT Starts the Marathon. *The New England journal of medicine*. 2015; 373(22): 2175-8.
31. Lackland DT, Carey RM, Conforto AB, Rosendorff C, Whelton PK, Gorelick PB. Implications of Recent Clinical Trials and Hypertension Guidelines on Stroke and Future Cerebrovascular Research. *Stroke*. 2018; 49(3): 772-9.
32. Tun NN, Arunagirinathan G, Munshi SK, Pappachan JM. Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. *World journal of diabetes*. 2017; 8(6): 235-48.
33. Shou J, Zhou L, Zhu S, Zhang X. Diabetes is an Independent Risk Factor for Stroke Recurrence in Stroke Patients: A Meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2015; 24(9): 1961-8.
34. Ceornodolea AD, Bal R, Severens JL. Epidemiology and Management of Atrial Fibrillation and Stroke: Review of Data from Four European Countries. *Stroke research and treatment*. 2017; 2017: 8593207.
35. Flint AC, Banki NM, Ren X, Rao VA, Go AS. Detection of paroxysmal atrial fibrillation by 30-day event monitoring in cryptogenic ischemic stroke: the Stroke and Monitoring for PAF in Real Time (SMART) Registry. *Stroke*. 2012; 43(10): 2788-90.
36. Kamel H, Healey JS. Cardioembolic Stroke. *Circ Res*. 2017; 120(3): 514-26.
37. Shah RS, Cole JW. Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2010; 8(7): 917-32.
38. Coutts SB. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017; 23(1, Cerebrovascular Disease): 82-92.
39. Malek AM, Cushman M, Lackland DT, Howard G, McClure LA. Secondhand Smoke Exposure and Stroke: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) Study. *American journal of preventive medicine*. 2015; 49(6): e89-97.

40. Lee PN, Forey BA. Environmental tobacco smoke exposure and risk of stroke in nonsmokers: a review with meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2006; 15(5): 190-201.
41. Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009; 339: b4567.
42. Zhou ML, Zhu L, Wang J, Hang CH, Shi JX. The inflammation in the gut after experimental subarachnoid hemorrhage. *The Journal of surgical research*. 2007; 137(1): 103-8.
43. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Archives of internal medicine*. 1991; 151(6): 1141-7.
44. Pan A, Sun Q, Okereke OI, Rexrode KM, Hu FB. Depression and risk of stroke morbidity and mortality: a meta-analysis and systematic review. *Jama*. 2011; 306(11): 1241-9.
45. Lambiase MJ, Kubzansky LD, Thurston RC. Prospective study of anxiety and incident stroke. *Stroke*. 2014; 45(2): 438-43.
46. Henderson KM, Clark CJ, Lewis TT, Aggarwal NT, Beck T, Guo H, et al. Psychosocial distress and stroke risk in older adults. *Stroke*. 2013; 44(2): 367-72.
47. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24(1): 35-41.
48. Yip PK, Jeng JS, Lee TK, Chang YC, Huang ZS, Ng SK, et al. Subtypes of ischemic stroke. A hospital-based stroke registry in Taiwan (SCAN-IV). *Stroke*. 1997; 28(12): 2507-12.
49. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet (London, England)*. 1991; 337(8756): 1521-6.
50. Caplan LR, DS. L. Pathology, anatomy and pathophysiology of stroke. LR C, editor. New York: Cambridge University Press; 2016.

51. Öge AE BB. İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Kitabı. 2.Baskı ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
52. Crocco T GJ. Rosen's Emergency Medicine. Philadelphia: Elsevier; 2014.
53. Kaviarasi S, Yuba E, Harada A, Krishnan UM. Emerging paradigms in nanotechnology for imaging and treatment of cerebral ischemia. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2019; 300: 22-45.
54. Grotta JC AG, Broderick JP, Kanser SE, Lo EH, Mendelow AD, Sacco RL, Wong LKS, Mohr JP. Stroke. Pathophysiology, Diagnosis and Management 6th ed ed: Elsevier; 2016.
55. Lin L, Wang X, Yu Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies. *Biochemistry & pharmacology: open access*. 2016; 5(4).
56. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews*. 2007; 54(1): 34-66.
57. Nagy Z, Nardai S. Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside. *Brain research bulletin*. 2017; 134: 30-7.
58. Meng H, Jin W, Yu L, Xu S, Wan H, He Y. Protective effects of polysaccharides on cerebral ischemia: A mini-review of the mechanisms. *International journal of biological macromolecules*. 2020.
59. Yu L, Tao J, Zhao Q, Xu C, Zhang Q. Confirmation of potential neuroprotective effects of natural bioactive compounds from traditional medicinal herbs in cerebral ischemia treatment. *Journal of integrative neuroscience*. 2020; 19(2): 373-84.
60. Chomova M, Zitnanova I. Look into brain energy crisis and membrane pathophysiology in ischemia and reperfusion. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*. 2016; 19(4): 341-8.
61. Yu L, Tao J, Zhao Q, Xu C, Zhang Q. Confirmation of potential neuroprotective effects of natural bioactive compounds from traditional medicinal herbs in cerebral ischemia treatment. *Journal of integrative neuroscience*. 2020; 19(2): 373-84.
62. Kutluk K. İskemik İnme. 1. Baskı ed. İzmir Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.

63. Kingham PJ, Pocock JM. Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *Journal of neurochemistry*. 2001; 76(5): 1475-84.
64. Rodriguez C, Agulla J, Delgado-Esteban M. Refocusing the Brain: New Approaches in Neuroprotection Against Ischemic Injury. *Neurochemical research*. 2021; 46(1): 51-63.
65. Liu F, Lu J, Manaenko A, Tang J, Hu Q. Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging and disease*. 2018; 9(5): 924-37.
66. Galkin A. Brain Ischemia/Reperfusion Injury and Mitochondrial Complex I Damage. *Biochemistry Biokhimiia*. 2019; 84(11): 1411-23.
67. Shao Z, Dou S, Zhu J, Wang H, Xu D, Wang C, et al. The Role of Mitophagy in Ischemic Stroke. *Frontiers in neurology*. 2020; 11: 608610.
68. Hannan MA, Dash R, Sohag AAM, Haque MN, Moon IS. Neuroprotection Against Oxidative Stress: Phytochemicals Targeting TrkB Signaling and the Nrf2-ARE Antioxidant System. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2020; 13: 116.
69. Meng H, Jin W, Yu L, Xu S, Wan H, He Y. Protective effects of polysaccharides on cerebral ischemia: A mini-review of the mechanisms. *International journal of biological macromolecules*. 2021; 169: 463-72.
70. Malko P, Jiang LH. TRPM2 channel-mediated cell death: An important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions. *Redox biology*. 2020; 37: 101755.
71. Nocella C, Cammisotto V, Pigozzi F, Borriero P, Fossati C, D'Amico A, et al. Impairment between Oxidant and Antioxidant Systems: Short- and Long-term Implications for Athletes' Health. *Nutrients*. 2019; 11(6).
72. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2015; 30(1): 11-26.
73. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010; 4(8): 118-26.
74. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*. 2015; 24(4): 325.

75. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009; 417(1): 1-13.
76. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *The Journal of biological chemistry*. 1978; 253(13): 4697-9.
77. Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*. 1983; 258(8): 4759-61.
78. MEMİŞOĞULLARI R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 7(3): 30-9.
79. Liao S, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The possible roles of necroptosis during cerebral ischemia and ischemia / reperfusion injury. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2020; 695: 108629.
80. Phillis JW. A "radical" view of cerebral ischemic injury. *Progress in neurobiology*. 1994; 42(4): 441-8.
81. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 2009; 7(1): 65-74.
82. Peng T, Jiang Y, Farhan M, Lazarovici P, Chen L, Zheng W. Anti-inflammatory Effects of Traditional Chinese Medicines on Preclinical in vivo Models of Brain Ischemia-Reperfusion-Injury: Prospects for Neuroprotective Drug Discovery and Therapy. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 204.
83. Sheikholeslami MA, Ghafghazi S, Pouriran R, Mortazavi SE, Parvardeh S. Attenuating effect of paroxetine on memory impairment following cerebral ischemia-reperfusion injury in rat: The involvement of BDNF and antioxidant capacity. *European journal of pharmacology*. 2021; 893: 173821.
84. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*. 2016; 15(8): 869-81.
85. ASLAN SN, KARAHALİL B. OKSİDATİF STRES VE PARKİNSON HASTALIĞI. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2019; 43(1): 94-116.

86. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*. 2004; 25(4): 612-28.
87. You H, Jin Y, Kang J, Mao Y, Su J, Sun L, et al. Mitochondrial serine protease Omi/HtrA2 accentuates brain ischemia/reperfusion injury in rats and oxidative stress injury in vitro by modulating mitochondrial stress proteins CHOP and ClpP and physically interacting with mitochondrial fusion protein OPA1. *Bioengineered*. 2020; 11(1): 1058-70.
88. Balch MHH, Nimjee SM, Rink C, Hannawi Y. Beyond the Brain: The Systemic Pathophysiological Response to Acute Ischemic Stroke. *Journal of stroke*. 2020; 22(2): 159-72.
89. De Luca C, Virtuoso A, Maggio N, Izzo S, Papa M, Colangelo AM. Roadmap for Stroke: Challenging the Role of the Neuronal Extracellular Matrix. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(20).
90. Levard D, Buendia I, Lanquetin A, Glavan M, Vivien D, Rubio M. Filling the gaps on stroke research: Focus on inflammation and immunity. *Brain, behavior, and immunity*. 2021; 91: 649-67.
91. Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, et al. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Frontiers in neurology*. 2020; 11: 594672.
92. Nishibori M, Wang D, Ousaka D, Wake H. High Mobility Group Box-1 and Blood-Brain Barrier Disruption. *Cells*. 2020; 9(12).
93. Sarvari S, Moakedi F, Hone E, Simpkins JW, Ren X. Mechanisms in blood-brain barrier opening and metabolism-challenged cerebrovascular ischemia with emphasis on ischemic stroke. *Metabolic brain disease*. 2020; 35(6): 851-68.
94. Wu S, Du L. Protein Aggregation in the Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Cellular and molecular neurobiology*. 2020.
95. Zhang X, Wei M, Fan J, Yan W, Zha X, Song H, et al. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons. *Autophagy*. 2020: 1-24.

96. Shi R, Weng J, Zhao L, Li XM, Gao TM, Kong J. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2012; 18(3): 250-60.
97. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*. 2000; 19(21): 5720-8.
98. Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational stroke research*. 2020; 11(6): 1185-202.
99. Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro-and antiapoptotic proteins. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2019; 24(9): 687-702.
100. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010; 11(9): 621-32.
101. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial Cell*. 2016; 3(3): 101.
102. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology*. 2008; 18(4): 157-64.
103. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*. 1999; 13(15): 1899-911.
104. Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005; 331(3): 761-77.
105. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal*. 2000; 14(5): 729-39.
106. Wang HB, Yang J, Ding JW, Chen LH, Li S, Liu XW, et al. RNAi-Mediated Down-Regulation of CD47 Protects against Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Damage via Activation of eNOS in a Rat Model. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2016; 40(5): 1163-74.

107. Bavarsad K, Barreto GE, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the nervous system. *Molecular neurobiology*. 2019; 56(2): 1391-404.
108. Stegner D, Klaus V, Nieswandt B. Platelets as Modulators of Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2505.
109. Gürkaş E. Uyanma İnmeleri ve 6 Saat Sonrası Başvuran Akut İnmelerde Endovasküler Tedavi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2019; 40(2): 7-10.
110. Kumar S, Kumari R, Mishra S. Pharmacological properties and their medicinal uses of Cinnamomum: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2019; 71(12): 1735-61.
111. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*. 2015; 7(9): 7729-48.
112. Johnson-Arbor K, Smolinske S. Stoned on spices: a mini-review of three commonly abused household spices. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa)*. 2021; 59(2): 101-5.
113. Hamidpour R, Hamidpour M, Hamidpour S, Shahlari M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaricidal, and repellent activities. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2015; 5(2): 66-70.
114. Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GA, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 275.
115. Sharma S, Mandal A, Kant R, Jachak S, Jagzape M. Is Cinnamon Efficacious for Glycaemic Control in Type-2 Diabetes Mellitus? *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2020; 70(11): 2065-9.
116. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*. 2006; 6: 39.

117. Azeredo CM, Santos TG, Maia BH, Soares MJ. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 309.
118. Choi O, Cho SK, Kim J, Park CG, Kim J. In vitro antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; 6(4): 308-14.
119. Long M, Tao S, De La Vega MR, Jiang T, Wen Q, Park SL, et al. Nrf2-dependent suppression of azoxymethane/dextran sulfate sodium–induced colon carcinogenesis by the cinnamon-derived dietary factor cinnamaldehyde. *Cancer Prevention Research*. 2015; 8(5): 444-54.
120. Schink A, Naumoska K, Kitanovski Z, Kampf CJ, Fröhlich-Nowoisky J, Thines E, et al. Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. *Food & function*. 2018; 9(11): 5950-64.
121. Jayaprakasha G, Rao LJM. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011; 51(6): 547-62.
122. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 2014.
123. Escop, Phytotherapy ESCo. ESCOP Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal products: Thieme; 2003.
124. Zhang X. WHO monographs on selected medicinal plants. vol. 2, Malta, world health organization. Geneva; 2002.
125. Orihara Y, Hamamoto H, Kasuga H, Shimada T, Kawaguchi Y, Sekimizu K. A silkworm–baculovirus model for assessing the therapeutic effects of antiviral compounds: characterization and application to the isolation of antivirals from traditional medicines. *Journal of general virology*. 2008; 89(1): 188-94.

126. Yang Y-C, Lee H-S, Lee SH, Clark JM, Ahn Y-J. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *International journal for parasitology*. 2005; 35(14): 1595-600.
127. Kitazuru E, Moreira A, Mancini-Filho J, Delincee H, Villavicencio ALCH. Effects of irradiation on natural antioxidants of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.). *Radiation Physics and Chemistry*. 2004; 71(1-2): 39-41.
128. Elgendy EM, Ibrahim HS, Elmecherry HF, Sedki AG, Mekhemer FU. Chemical and biological comparative in vitro studies of cinnamon bark and lemon peel essential oils. *Food and Nutrition Sciences*. 2016; 8(1): 110-25.
129. Tran HN, Graham L, Adukwu EC. In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; 104(20): 8911-24.
130. Elcocks E, Spencer-Phillips P, Adukwu E. Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*. 2020; 128(4): 1025-37.
131. Sawicki R, Golus J, Przekora A, Ludwiczuk A, Sieniawska E, Ginalska G. Antimycobacterial activity of cinnamaldehyde in a *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) model. *Molecules*. 2018; 23(9): 2381.
132. Qin B, Panickar KS, Anderson RA. Cinnamon: potential role in the prevention of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. *Journal of diabetes science and technology*. 2010; 4(3): 685-93.
133. Beji RS, Khemir S, Wannes WA, Ayari K, Ksouri R. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant influences of the spice cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) in experimental rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54(2).
134. Gulcin I, Kaya R, Goren AC, Akincioglu H, Topal M, Bingol Z, et al. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*. 2019; 22(1): 1511-26.

135. Li J, Teng Y, Liu S, Wang Z, Chen Y, Zhang Y, et al. Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology reports*. 2016; 35(3): 1501-10.
136. Qabaha K, Abu-Lafi S, Al-Rimawi F. Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Extracts of curcuma Longa (Turmeric) and cinnamon (Cinnamomum verum). 2017.
137. Kubatka P, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, Vybohova D, et al. Chemopreventive and therapeutic efficacy of Cinnamomum zeylanicum L. bark in experimental breast carcinoma: mechanistic in vivo and in vitro analyses. *Molecules*. 2020; 25(6): 1399.
138. Sohrabi R, Pazgoohan N, Seresht HR, Amin B. Repeated systemic administration of the cinnamon essential oil possesses anti-anxiety and anti-depressant activities in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2017; 20(6): 708.
139. Panickar KS, Polansky MM, Anderson RA. Cinnamon polyphenols attenuate cell swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in glial cells. *Experimental neurology*. 2009; 216(2): 420-7.
140. Uzbay IT, Sever B, Çelik T, Ayhan IH. Investigation of the effects of moclobemide in chronic ethanol feeding rats. *Pharmacological research*. 1995; 32(5): 287-92.
141. Pahan P, Pahan K. Can cinnamon bring aroma in Parkinson's disease treatment? *Neural regeneration research*. 2015; 10(1): 30.
142. Galimberti D, Fenoglio C, Scarpini E. Inflammation in neurodegenerative disorders: friend or foe? *Current aging science*. 2008; 1(1): 30-41.
143. Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2012; 7(2): 424-35.
144. Jana A, Modi KK, Roy A, Anderson JA, van Breemen RB, Pahan K. Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013; 8(3): 739-55.

145. Khasnavis S, Pahan K. Cinnamon treatment upregulates neuroprotective proteins Parkin and DJ-1 and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2014; 9(4): 569-81.
146. Raha S, Dutta D, Roy A, Pahan K. Reduction of Lewy Body Pathology by Oral Cinnamon. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2020: 1-17.
147. Bae W-Y, Choi J-S, Jeong J-W. The neuroprotective effects of cinnamic aldehyde in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(2): 551.
148. Qubty D, Rubovitch V, Benromano T, Ovadia M, Pick CG. Orally Administered Cinnamon Extract Attenuates Cognitive and Neuronal Deficits Following Traumatic Brain Injury. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2021; 71(1): 178-86.
149. Modi KK, Roy A, Brahmachari S, Rangasamy SB, Pahan K. Cinnamon and its metabolite sodium benzoate attenuate the activation of p21rac and protect memory and learning in an animal model of Alzheimer's disease. *PloS one*. 2015; 10(6): e0130398.
150. Kazerouni A, Nazeri M, Karimzadeh A, SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F, et al. Sub-chronic oral cinnamaldehyde treatment prevents scopolamine-induced memory retrieval deficit and hippocampal Akt and MAPK dysregulation in male mice. *Neurological research*. 2020; 42(2): 99-107.
151. Momtaz S, Hassani S, Khan F, Ziaee M, Abdollahi M. Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. *Pharmacological research*. 2018; 130: 241-58.
152. Do J, Kim N, Jeon SH, Gee MS, Ju Y-J, Kim J-H, et al. Trans-Cinnamaldehyde Alleviates Amyloid-Beta Pathogenesis via the SIRT1-PGC1 α -PPAR γ Pathway in 5XFAD Transgenic Mice. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(12): 4492.
153. Mondal S, Pahan K. Cinnamon ameliorates experimental allergic encephalomyelitis in mice via regulatory T cells: implications for multiple sclerosis therapy. *PloS one*. 2015; 10(1): e0116566.
154. Pahan K. Prospects of cinnamon in multiple sclerosis. *Journal of multiple sclerosis*. 2015; 2(3): 1000149.

155. Pahan S, Pahan K. Can cinnamon spice down autoimmune diseases? *Journal of clinical & experimental immunology*. 2020; 5(6): 252.
156. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*. 2004; 25(4): 612-28.
157. Sanyal J, Bandyopadhyay S, Banerjee T, Mukherjee S, Chakraborty D, Ray B, et al. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2009; 13(2): 129-32.
158. Aoyama K, Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(10): 21021-44.
159. Rodriguez C, Agulla J, Delgado-Esteban M. Refocusing the brain: new approaches in neuroprotection against ischemic injury. *Neurochemical research*. 2020: 1-13.
160. Zhang J, Zhou R, Xiang C, Fan F, Gao J, Zhang Y, et al. Enhanced thioredoxin, glutathione and Nrf2 antioxidant systems by safflower extract and aceglutamide attenuate cerebral ischaemia/reperfusion injury. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020; 24(9): 4967-80.
161. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010; 4(8): 118.
162. Zujko M, Witkowska A, Waśkiewicz A, Sygnowska E. Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Advances in medical sciences*. 2012; 57(2): 375-84.
163. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, et al. The role of antioxidant enzymes in oxidative stress—superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). *Med J SDU*. 2019; 26: 362-9.
164. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, Ramos L, Argueso M, et al. Association between total antioxidant capacity and mortality in ischemic stroke patients. *Annals of intensive care*. 2016; 6(1): 1-6.
165. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004; 37(4): 277-85.

166. Eken A. Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2017; 69-73.
167. Sies H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *The Journal of nutrition*. 2007; 137(6): 1493-5.
168. Sahika G, Tahir M, Ziya A. Total oxidative stress, total antioxidant status and erythrocytes status in patients with acute ischemic stroke. *Acta Med Mediterr*. 2017; 33: 157E.
169. Sobowale OA, Parry-Jones AR, Smith CJ, Tyrrell PJ, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 in stroke: from bench to bedside. *Stroke*. 2016; 47(8): 2160-7.
170. Chen S, Chen H, Du Q, Shen J. Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: potential application of natural compounds. *Frontiers in physiology*. 2020; 11: 433.
171. Cojocaru IM, Cojocaru M, Iliescu I, Botnaru L, Gurban CV, Sfrijan F, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2010; 48(1): 101-4.
172. Kim HJ, Wei Y, Wojtkiewicz GR, Lee JY, Moskowitz MA, Chen JW. Reducing myeloperoxidase activity decreases inflammation and increases cellular protection in ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2019; 39(9): 1864-77.
173. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The Open Neurology Journal*. 2010; 4: 34.
174. Handayani ES, Susilowati R, Setyopranoto I, Partadiredja G. Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (tBCCAO) of Rats as a Model of Global Cerebral Ischemia. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2019; 18(3): 491-500.
175. European Pharmacopoeia. Cinnamon bark oil, Ceylon. 5 ed. Strazburg 2005.
176. Yüce A, Türk G, Çeribaşı S, Güvenç M, Çiftçi M, Sönmez M, et al. Effectiveness of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil in the prevention of carbon tetrachloride-induced damages on the male reproductive system. *Andrologia*. 2014; 46(3): 263-72.

177. Uzbay IT, Wallis CJ. Lack of tolerance to ethanol-induced motor impairment on accelerated performance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1999; 63(4): 607-11.
178. Uzbay IT, Kayaalp SO. Heterogeneity of tolerance developed to effects of ethanol on rotarod and accelerated performances in rats. *Alcohol*. 1995; 12(6): 593-5.
179. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72: 248-54.
180. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*. 1969; 244(22): 6049-55.
181. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology*. 1981; 77: 373-82.
182. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global burden of stroke. *Circulation research*. 2017; 120(3): 439-48.
183. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2014; 383(9913): 245-55.
184. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet Global Health*. 2013; 1(5): e259-e81.
185. Feigin VL, Norrving B, George MG, Foltz JL, Roth GA, Mensah GA. Prevention of stroke: a strategic global imperative. *Nature Reviews Neurology*. 2016; 12(9): 501.
186. Krishnamurthi RV, Moran AE, Feigin VL, Barker-Collo S, Norrving B, Mensah GA, et al. Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in adults aged 20-64 years in 1990-2013: data from the global burden of disease 2013 study. *Neuroepidemiology*. 2015; 45(3): 190-202.
187. Feigin VL, Krishnamurthi RV, Parmar P, Norrving B, Mensah GA, Bennett DA, et al. Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990-2013: the GBD 2013 study. *Neuroepidemiology*. 2015; 45(3): 161-76.

188. Sharma D, Maslov LN, Singh N, Jaggi AS. Remote ischemic preconditioning-induced neuroprotection in cerebral ischemia-reperfusion injury: Preclinical evidence and mechanisms. *European journal of pharmacology*. 2020: 173380.
189. Gökten M. Selektif Transarteryal Mikrokaterizasyon Yöntemi ile Parçalanabilir Nişasta Mikrokürecikleri Kullanılarak Geçici Serebral İskemi Modeli Oluşturularak İntrakarotid Sodyum Tiopental Uygulamasının Geçici İskemi Süresine Etkisinin Araştırılması. 2018.
190. Gao Y, Li M, Wang Y, Li Z, Fan C, Wang Z, et al. Protective Effects of Sodium ($\pm$)-5-Bromo-2-(α -Hydroxypentyl) Benzoate in a Rodent Model of Global Cerebral Ischemia. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 691.
191. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. Cinnamon effects on metabolic syndrome: a review based on its mechanisms. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016; 19(12): 1258.
192. Panickar KS, Qin B, Anderson RA. Ischemia-induced endothelial cell swelling and mitochondrial dysfunction are attenuated by cinnamtannin D1, green tea extract, and resveratrol in vitro. *Nutritional neuroscience*. 2015; 18(7): 297-306.
193. Armogida M, Nisticò R, Mercuri NB. Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *British journal of pharmacology*. 2012; 166(4): 1211-24.

