



**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL SEREBRAL
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
İNTRANAZAL SALUSİN- β UYGULAMASININ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif TUTAR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

Yüksek Lisans Tezi – 2025

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

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL SEREBRAL
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE İNTRANAZAL SALUSİN-β
UYGULAMASININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif TUTAR

Fizyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

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

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Süleyman SANDAL
Prof. Dr. Suat TEKİN
Prof. Dr. Emine KAÇAR**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi
Tarafından TYL-2022-2861 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2025**

KABUL ONAY SAYFASI



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Süleyman SANDAL” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine İntranazal Salusin- β Uygulamasının Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 14/04/2025

Elif TUTAR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beynin Kanlanması	3
2.2. Willis Poligonu	3
2.3. İnme	5
2.3.1. Hemorajik inme	5
2.3.2. İskemik İnme/Serebral İskemi	6
2.4. Salusinler	12
2.4.1. Salusin- β	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Deneyin Yapıldığı Merkez	17
3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi	17
3.3. Deney Hayvanlarının Rasgele Gruplara Yerleştirilmesi	17
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Tasarımı	18
3.5. Hayvanların Anesteziye Alınarak Cerrahi Operasyonlara Hazırlanması	18
3.6. Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması	19
3.7. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri	20
3.7.1. NDS Testi	20
3.7.2. Rotarod Testi	21
3.7.3. Yapışkan Çıkarma Testi	22
3.7.4. Kavrama Gücü (Grip Strength) Testi	23
3.8. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması	23
3.9. Analizlerin Yapılması	24
3.9.1. TTC Boyama ile Beyin İnfarkt Alanının Gösterilmesi	24
3.9.2. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik ve Otofajik Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi	25

3.10. İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR	31
4.1. Salusin- β 'nın NDS ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi	31
4.1.1. Salusin- β 'nın NDS Üzerine Etkisi.....	31
4.1.2. Salusin- β 'nın Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi	32
4.1.3. Salusin- β 'nın Yapışkan Çıkarma Süresi Üzerine Etkisi	33
4.1.4 Salusin- β 'nın Kavrama Gücü (Grip Strenght) Testi Üzerine Etkisi	34
4.2. Salusin- β 'nın İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi	35
4.3. Salusin- β 'nın Apoptotik ve Otofajik Protetin Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	35
4.3.1. Salusin- β 'nın Apoptotik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	35
4.3.2. Salusin- β 'nın Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	36
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	47
EKLER	58
EK-1. Özgeçmiş	58
EK-2. Etik Kurul Kararı	59

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitim sürecimde ve tezimin tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını hiçbir şekilde esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma, çalışmamın analiz aşamalarında destekleri için İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Kevser TANBEK'e, çalışmamdaki deneyler ile tez yazımı sırasındaki katkılarından dolayı Dr. Furkan YÜKSEL, Dr. Engin KORKMAZ, Tuba KESKİN, Güldeniz ŐEKERCİ, Elif Maide BEYOĞLU ve Semiha Nur ÖZKAYA'ya,

Tüm yaşamım boyunca aldığım her kararda ve attığım her adımda sevgisini, desteğini benden bir an olsun bile esirgemeyen kıymetli anne, babama ve yolumu aydınlatıp bana ışık olan canım kızım Güneş TUTAR'a,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TYL-2022-2861) tarafından desteklenmiştir.

Elif TUTAR

ÖZET

Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine İntranazal Salusin- β Uygulamasının Etkilerinin Araştırılması

Amaç: İntranazal Salusin- β uygulamasının serebral iskemi/reperfüzyon (Sİ/R) hasarındaki muhtemel koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve metot: Çalışmada 27 adet *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçan kontrol, Sİ/R ve Sİ/R+ Salusin- β olmak üzere üç gruba (n=9) ayrıldı. Kontrol dışındaki gruplara 90 dakikalık serebral iskemi (Sİ) ve sonrasında 3 gün reperfüzyon uygulandı. Sİ'den bir saat sonra intraperitoneal yolla Sİ/R grubuna hidroksetil selüloz, Sİ/R+Salusin- β grubuna ise intranazal olarak 300nM Salusin- β infüzyonu uygulandı. Üç günlük reperfüzyon boyunca sıçanlara nörolojik defisit skorlama (NDS), rotarod, yapışkan çıkarma ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Deney sonunda hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan, Western Blot yöntemi ile apoptoz (BCL-2) ve otofaji (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerinin seviyeleri belirlendi.

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

Sonuç: Salusin- β 'nın NDS'yi düşürdüğü görüldü. Davranış testlerinde de denge-motor koordinasyonu, somatosensör ve güç kaybını iyileştirdiği saptandı. Bunların yanı sıra apoptotik protein seviyelerinde apoptozu inhibe edecek yönde otofajik protein seviyelerinde otofajiyi indükleyecek yönde etkilediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Salusin- β , Serebral İskemi, Otofaji

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Intranasal Salusin- β Administration on Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

Aim: The aim was to investigate the potential protective effects of intranasal Salusin- β administration in cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury.

Material and method: The Sprague Dawley male rats included in the study were divided into three groups (n=9): control, I/R, and I/R+Salusin- β . In the groups other than the control, a 90-minute ischemia was applied. One hour after ischemia, the I/R group received intraperitoneal hydroxyethyl cellulose, while the I/R+Salusin- β group was administered 300 nM Salusin- β intranasally. During the three-day reperfusion period, the rats underwent NDS, rotarod, sticky label removal, and grip strength tests. At the end of experiment animals were decapitated and brain tissues were collected. In collected brain tissues, infarct area was determined using TTC staining, and the levels of apoptosis (BCL-2) and autophagy (Beclin-1, ATG5, ATG7, and p62) proteins were analyzed using Western Blot method.

Results: The NDS score and sticky label removal time of the control and I/R+Salusin- β groups were lower, while the rotarod endurance time and grip strength were higher compared to the I/R group ($p<0.05$). The infarct area in the I/R group was found to be larger compared to the control and I/R+Salusin- β groups($p<0.05$). The levels of BCL-2, Beclin-1, ATG5, and ATG7 proteins were higher in the I/R+Salusin- β group compared to I/R group, while the levels of p62 proteins were lower($p<0.05$).

Conclusion: It was observed that Salusin- β reduced neurological deficit score. Behavioral tests showed improvement in balance-motor coordination, somatosensory functions, and strength loss. Additionally, it was found that Salusin- β reduced the infarct area caused by I/R injury. Furthermore, Salusin- β was found to inhibit apoptosis by affecting apoptotic protein levels and induce autophagy by influencing autophagic protein levels.

Keywords: Apoptoz, Salusin- β , Cerebral Ischemia, Autophagy

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik Asit
BAX	: BCL-2 ile İlişkili X
BCA	: Bisinkoninik Asit
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma-2
BSA	: Bovine Serum Albümin
IKA	: İnternal Karotid Arter
KKA	: Kommon Karotid Arter
NDS	: Nörolojik Defisit Skorlama
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
OSAO	: Sağ Orta Serebral Arterin Oklüzyonu
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PVDF	: Poliviniliden Florür
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sİ	: Serebral İskemi
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TTC	: 2,3,5-Trifenil Tetrazolium Klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Willis poligonu	4
Şekil 2.2. İnsan ve sıçanlarda Willis poligonu yapısı	5
Şekil 2.3. Na ⁺ /K ⁺ Pompasının işlevinde bozulma.....	9
Şekil 2.4. Sİ’de apoptozun seyri	11
Şekil 2.5. Sİ’de otofaji süreci	12
Şekil 2.6. Salusin-β’nin amino asit dizilimi	13
Şekil 3.1. Deneysel Sİ/R modelinin şematik gösterimi	19
Şekil 3.2. Hayvanların nörolojik durumun gözlemlenmesi	21
Şekil 3.3. Rotarod cihazının ayarlanması ve hayvanların yerleştirilmesi.....	22
Şekil 3.4. İnfarkt alanın yüzdesel olarak hesaplanması.....	25
Şekil 3.5. Western Blot analizine genel bakış.....	25
Şekil 4.1. Salusin-β’nin NDS üzerine etkisi	31
Şekil 4.2. Salusin-β’nin rotarod test süresi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.3. Salusin-β’nin yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.4. Salusin-β’nin kavrama gücü (grip strenght) testi ile hesaplanan sol pençe/sağ pençe kavrama gücü oranı üzerine etkisi	34
Şekil 4.5. Salusin-β’nin infarkt alan üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.6. Salusin-β’nin BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.7. Salusin-β’nin Beclin-1 seviyeleri üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.8. Salusin-β’nin ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi	38
Şekil 4.9. Salusin-β’nin p62 protein seviyesi üzerine etkisi.....	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Bederson skörlama metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi	21
Tablo 3.2. Running Jel (%10) hazırlığında kullanılan reaktifler ve hacimleri	27
Tablo 3.3. Stacking Jel (%5)'in hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve hacimleri	27

1. GİRİŞ

İnme, beynin damarlarında oluşan bir tıkanıklık ya da kanama sonucu, beynin belirli bir bölgesine ya da tamamına oksijen ve besin maddelerinin yeterince ulaşamaması durumunda meydana gelir. Beynin farklı bölgelerinde çeşitli fonksiyon kayıplarına yol açabilir (1). En yaygın nörolojik hastalık olan inme tüm dünyada ikinci ölüm nedenidir (2). İnme; denge, hareket, konuşma, yutma, idrar yapma ve dışkılama gibi temel işlevlerde bozulmalara yol açarak geniş bir nörolojik rahatsızlık yelpazesi oluşturur ve sağlık sistemi üzerinde büyük bir mali yük meydana getirir (3). Serebral iskemi (Sİ), beyne kan taşıyan damarların ani tıkanmasıyla, oksijen ve glikoz temininde aksama yaşanması sonucu meydana gelen ve hücrel metabolizmayı olumsuz etkileyen ciddi bir klinik tablodur (4). Reperfüzyon ise çeşitli mekanizmalar sonucu tıkanan kan akışının düzenlenmesi ile iskemik bölgenin yeniden oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyonun, Sİ'ye nedenli aşırı metabolik stresi hafifletmesi, dolayısıyla doku hasarını azaltması beklenir. İlginç bir şekilde reperfüzyon sonrası oluşan doku hasarı sadece iskemi sonucunda oluşan doku hasarından fazladır. Yani Sİ'yi takip eden reperfüzyonun enfarktüs boyutunu artırarak serebral hasarı şiddetlendirdiği görülür (5, 6). Serebral iskemi/reperfüzyon (Sİ/R) hasarından en çok etkilenen bölge kor (çekirdek) bölgesidir ve burayı çevreleyen alan penumbra alanı olarak adlandırılır (7). Kor bölgesinde daha kalıcı hasarlar oluşurken, periferik gidildikçe bu hasarın hafiflediği görülmüştür. Bundan dolayı penumbra, potansiyel olarak kurtarılabilir bir alan olarak nitelendirilmiştir (8).

Sİ/R hasarının iyileştirilmesiyle amacıyla yapılan farklı yaklaşımlar mevcuttur (9, 10). Bu yaklaşımlarda arasında farmakolojik olanlar daha yaygındır. Ve bunlara ek olarak iskemik hasarın iyileştirilmesinde umut vadeden ajanlar ile ilgili çalışmalar da devam etmiştir (11, 12).

Salusin- β , bir insan cDNA kütüphanesinin in silico analizini kullanarak tespit edilmiş güçlü bir biyoaktif peptittir. Salusin- β benzeri immünoreaktivite daha sonra insan plazmasında ve idrarında gösterilmiştir (13). Salusinlerin üretimi; kalp, beyin, bağırsak ve damar yapıları dahil olmak üzere pek çok farklı dokuda gerçekleşmektedir (14). Salusin- β , sistemik parasempatik stimülasyon ve negatif kardiyotropik inotropizm aracılığıyla aracılık edilen hipotansif ve bradikardik etkiler dahil, kombine sistemik ve lokal biyolojik eylemler uygular (15). Santral Salusin- β , antidipsogenezi indükleyerek, kan basıncını yükselterek ve vazopressin, oksitosin sekresyonunu uyarak hemodinamik

homeostazı düzenler (13). Salusin- β 'nın periferik aktiviteleri, güçlü proaterosklerotik etkilerini ve kardiyak yeniden şekillenmenin baskılanmasını içerir. Bu tür güçlü biyolojik aktivitelere ek olarak, belirli insan hastalıkları için bir biyobelirteç olarak da önerilmiştir (16). İmmünohistokimyasal boyama yöntemleriyle, beynin epitel hücre tabakasının hem Salusin- α hem de Salusin- β sentezleyebildiği ortaya konmuştur. Metabolik sendrom geliştiğinde, bu peptitlerin sentezinde azalma meydana gelmiş ve bu azalma, dolaşımdaki salusin düzeylerine de yansımıştır. Benzer şekilde, karaciğerde yer alan Kupffer hücreleri ile hepatosellüler hücrelerin de her iki salusin türünü üretebildiği belirlenmiştir. Metabolik sendrom koşullarında, karaciğerdeki Salusin- α ve Salusin- β düzeylerinde de beyin dokusundakine benzer şekilde düşüş gözlenmiştir. Dolaşımdaki Salusin- α ve Salusin- β konsantrasyonlarının metabolik sendrom sırasında azalması, bu parametrelerin glukoz düzeyi, HDL-C, hipertansiyon, trigliserid ve bazal metabolizma hızı gibi ATP-III tanı kriterlerine eklenerek, hastalığın tanı ve takibinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (17). Salusin- α ve Salusin- β 'nın oksidatif hasar ve tümör nekroz faktörü(TNF)- α seviyeleri üzerindeki etkileri ile kaspaz-3 ekspresyonu üzerindeki baskılanması, bu iki hormonun anti ülseratif ajanlar olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (18). Salusinler, vasküler düz kas fibroblast hücrelerinin proliferasyonunda önemli roller oynar ve ayrıca kardiyomiyositlerin apoptozunu inhibe etme yeteneğine sahiptir (19). Salusin- β 'nın farelerde intranasal uygulamasının Parkinson hastalığında ortaya çıkan nörodejenaratif bozuklukları düzelttiği gösterilmiştir (20). Çakır ve ark. yaptıkları bir çalışmada Multiple Skleroz (MS) hastalarında Salusin- α ve Salusin- β seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunu göstermişlerdir (21). Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında Salusin- α ve Salusin- β uygulaması antioksidan enzim aktivasyonunu arttırdığı ve lipid oksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (22). Yapılan bir çalışmada 256 hastanın analizine dayanarak Salusin- α ve Salusin- β 'nın koroner arter hasarı veya darlığı üzerindeki etkileşim etkisini ortaya koyduğu ve koroner ateroskleroza değerlendirmede potansiyel bir belirteç olarak Salusin- β 'nın Salusin- α 'ya üstün olduğunu gösterilmiştir (23). Planlanan bu tez çalışmasında, Salusin- β 'nın Sİ/R hasarında tedavi edici etkinliği olup olmadığının ve Salusin- β 'nın, Sİ/R hasarı nedenli denge motor koordinasyonu, somatosensör ve güç kaybını iyileştirip iyileştirmeyeceğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beynin Kanlanması

İnsan beyni vücut ağırlığının yaklaşık %2-3'lük bir kısmını oluşturur. Toplam kalp debisinin %15'i gibi küçük bir yüzdeye ihtiyaç duymasına rağmen istirahatte toplam oksijen tüketiminin %20'sini tüketir (24). Sinir hücreleri ve glial yapıların, membran potansiyelinin korunması ve nörotransmitter işlevlerinin devamı gibi temel süreçleri sürdürebilmek adına kesintisiz bir şekilde aktif kalmaları gerekmektedir. Tüm bu işlemlerin sorunsuz ve düzenli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için beyin hücreleri, vücudun diğer organlarına oranla çok daha fazla oksijen ve enerjiye gereksinim duyar (25). Beyin tüm bu işlemleri gerçekleştirmek için gerekli olan enerjiyi glukozun oksidasyonundan sağlar (26).

İnsan beyni, dakikada 100 g beyin dokusu başına 3,5 ml O₂ tüketir. Bu değer uyanıklık ve uyku dönemleri boyunca sabit kalır. Beyin içindeki oksijen tüketimi oldukça dinamik ve bölgeye özgüdür. Gri madde, beyaz maddeden iki kat daha fazla oksijen tüketir ve en yüksek tüketim medial oksipital lobda meydana gelir (27).

Beyne kan temini, sırasıyla akışın %70 ve %30'unu sağlayan iki internal karotid arterleri (IKA'lar) ve vertebrobaziler sistem aracılığıyla sağlanır. Vertebral arterler, subklavian arterlerden kaynaklanır ve baziler arteri oluşturmak üzere birleşir. Bu baziler arter daha sonra tekrar bölünerek IKA'larla anastomoz yapan ve beynin tabanında Willis Poligonu adı verilen bir sistem oluşturan arka serebral arterleri oluşturur (28).

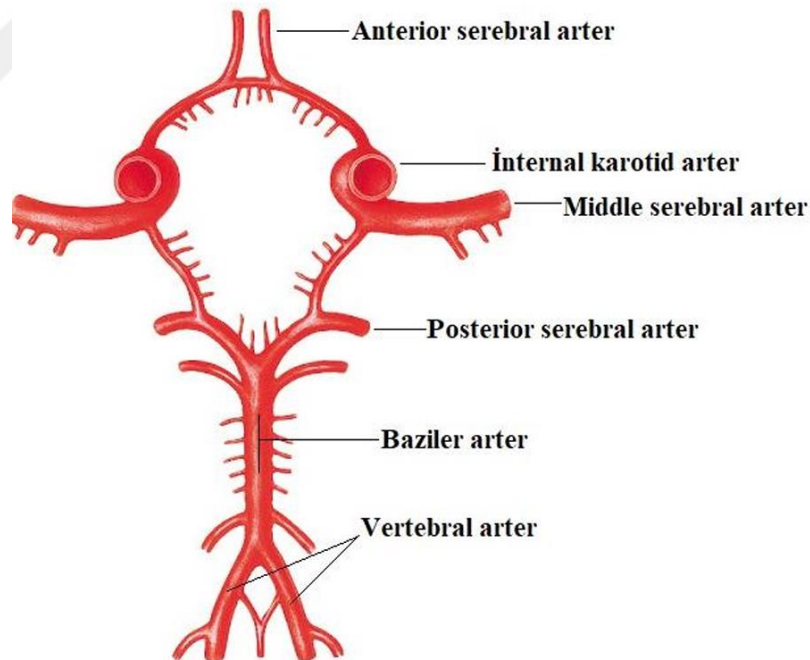
2.2. Willis Poligonu

Willis poligonuna ilişkin ilk tanımlamalar, Roma dönemine kadar uzanmaktadır. Bu yapının, Herophilus ve Galen tarafından "Rete Mirabile" (harikulade ağ) olarak adlandırıldığı bilinmektedir. Orta Çağ'da El-Razi ve İbn-i Sina gibi İslam dünyasının önemli hekimleri, bu yapının anlaşılmasına katkı sağlamış; Rönesans döneminde ise Leonardo da Vinci, Vesalius ve Sylvius gibi anatomistler, konuya ilişkin bilgileri daha da geliştirmiştir. İlk kesin tanımlama, 1664 yılında Thomas Willis tarafından yapılmıştır ve bu yapıya Willis Poligonu adı verilmiştir (29). Willis Poligonunun işlevi, beyni iskemiden korumaktır. Bu yapı, iki taraftan gelen kanın beynin farklı bölümlerine eşit şekilde dağılmasını sağlar ve beynin arterlerinden birinin tıkanması durumunda, çalışma

mekanizması sayesinde beynin her bölgesinin beslenmesi devam eder. Böylece, beynin kan dolaşımı durmaksızın sürdürülmüş olur (29).

Willis Poligonu beynin tabanında yer alan, beyne sürekli ve düzenli kan akışı sağlayan ana yapıdır. Willis halkası bir arteriyel poligondur ve *a. karotis interna* ve *a. basilaris* arterlerinin dallarından oluşan bir vasküler halkadır. Bu halka, anterior serebral arterlerin bilateral A1 segmentlerinden, bu 2 arteri birbirine bağlayan anterior iletişim arterinden (İng. Anterior communicating artery), posterior serebral arterlerin bilateral P1 segmentlerinden ve IKA posterior serebral arterlere bağlayan posterior iletişim arterlerinden oluşur (30).

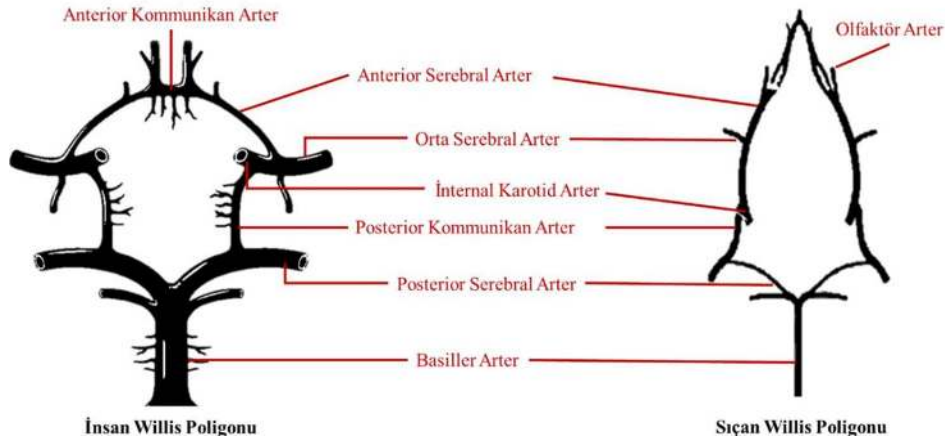
Beyne yatay olarak yerleştirilmiş bir taç hayal ederek Willis Poligonu'nu görselleştirebiliriz. İki ana atardamar, internal karotisler, frontal bölgeye kan gönderirken, daha az önemli iki damar, baziler atardamarda birleşen vertebral atardamarlar, posterior tarafı besler. Böyle bir taç veya halka benzeri yerleşim, kan akışını serebrum boyunca çok verimli ve oldukça güvenli bir şekilde dağıtır (31). Willis Poligonu'nda yer alan damarlar Şekil 2.1'de gösterildi.



Şekil 2.1. Willis poligonu (32).

Sıçan ve insan Willis Poligonu, büyük ölçüde benzer olsa da serebral halkada morfolojik farklılıklar mevcuttur (Şekil 2.2). İnsan Willis Poligonundaki anterior serebral arterler sıçanlarda bulunmamakta, sıçanlardaki olfaktör arterler de insan Willis Poligonunda yer almamaktadır. Sıçanlarda IKA'ların Willis Poligonu'na katılması dikkat

çekmektedir. Bunun aksine insanlarda IKA'lar Willis Poligonu'na dahil olmadan dallanır (33).



Şekil 2.2. İnsan ve sıçanlarda Willis poligonu yapısı

2.3. İnme

İnme, Dünya Sağlık Örgütü tarafından, belirgin bir neden olmaksızın, serebral dolaşım bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan, ani başlangıçlı ve odaklanmış nörolojik kayıplarla seyreden klinik bir sendrom şeklinde tanımlanmaktadır. Semptomlar, 24 saatten uzun süre devam edebilir veya ölümle sonuçlanabilir. Sendromun şiddeti, tam iyileşme, kısmi iyileşme, ağır engellilik ve ölüm gibi farklı sonuçları içeren geniş bir değişkenlik gösterir (2). İnme, küresel ölçekte ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almakta olup, kalıcı sakatlık ve iş gücü kaybına yol açması açısından ise başlıca nedenlerden biridir (34). İnme, hemorajik inme ve iskemik inme/Sİ olarak adlandırılan iki şekilde görülebilir. Sİ, tüm inmelerin yaklaşık %71'i gibi büyük bir kısmını, hemorajik inme ise yaklaşık %29'unu oluşturmaktadır (35).

2.3.1. Hemorajik inme

Hemorajik inme beyne giden kan damarlarının zarar görmesi ve/veya yırtılması sonucu meydana gelen beyin kanaması olarak tanımlanabilir (36). Hemorajik inmelerin nedenleri arasında, yüksek tansiyon ve damar anormallikleri başlıca etkenlerdir. Ayrıca, amfetamin ve kokain gibi uyuşturucu maddelerin kullanımı, sigara içme ve kanama bozuklukları da diğer önemli nedenlerdir. Antiplatelet ve kan sulandırıcı ilaçlar da beyin içi kanama riskini artıran ilaçlar arasında yer alır (36). Hemorajik inme oluşumunda en sık rastlanan nedenler hipertansiyon ve damar yapısındaki anormalliklerdir. Ayrıca, amfetamin ve kokain gibi yasadışı maddelerin kullanımı, tütün tüketimi ve kan pıhtılaşma

bozuklukları da bu durumun gelişmesine katkıda bulunan diğer etkenlerdir. Antiagregan ve antikoagülan ilaçlar da intrakranial kanama riskini arttıran ilaçlardır (37).

2.3.2. İskemik İnme/Serebral İskemi

Sİ (inme), genellikle beynin bir bölümüne giden kan akışının bir damarın tıkanması sonucu aniden kesilmesiyle oksijen ve glikoz yoksunluğunun meydana gelmesi ve bunun sonucunda oluşan aşırı metabolik stres biçimi olarak tanımlanabilir (4).

Bu oluşan damar tıkanıklığının birincil nedenleri kan damarlarının duvarlarında plak oluşumu ve kanın damar içerisinde pıhtılaşarak tromboz veya emboli oluşumudur. Bu plakların oluşumunu tetikleyen etkenler ise, kanda bulunan kolesterol, trigliserit ve diğer maddelerin (kalsiyum, hücrel atıklar vb.) vasküler duvarlarda birikmesidir. Damar duvarlarındaki hasar sonucu kanda bulunan pıhtılaşma faktörlerinin etkisiyle tromboz meydana gelir. Tromboz ise damar çeperine yapışarak pıhtı veya emboli oluşumuna neden olur (38).

Epidemiyolojisi

Dünya genelinde inme, ölümlerin ve engelliliğin en yaygın ikinci nedenidir (39). 25 yaş ve bu yaşı geçmiş olan yetişkin erkek ve kadınlarda yaşam boyu inme riski 1/4 olarak bildirilmiştir. Yaş ilerledikçe inme riski artmaktadır. İnme görülme sıklığının en yüksek olduğu bölgeler arasında Doğu Asya, Orta Avrupa ve Doğu Avrupa ön plana çıkmaktadır (39). İnmeye bağlı ölümlerin ve engelliliğin toplam sayısı yüksektir ve her geçen zamanda bu sayı da artmaktadır (39). Cinsiyet dağılımında ise yaşam boyu inme riski kadınlarda erkeklere kıyasla daha yüksektir (40).

Nedenleri ve Risk Faktörleri

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde bazı demografik özelliklerin, metabolik dengedeki bozukluklar ile kronik hastalıkların ve olumsuz yaşam tarzının Sİ'ye neden olabileceği ve/veya Sİ için risk faktörü olabileceği belirlenmiştir (41). Risk faktörleri modifiye edilebilir ve modifiye edilemez faktörler olarak iki temel gruba ayrılır (42, 43).

Modifiye edilemez risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, ırk, aile öyküsü ve geçmişteki sağlık sorunları yer almaktadır. Erkekler için 45 yaş, kadınlar için ise 55 yaş ve üzeri, bu durum klinik anlamda dikkate alınması gereken kritik bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, erkeklerde Sİ riski kadınlara kıyasla daha yüksektir. Irk açısından, siyahi, Japon ve Çinli bireylerde, beyazlara oranla bu risk artmaktadır. Aile öyküsü de önemli bir rol oynar; çevresel ve genetik faktörler, bireylerin riskini artırabilir.

Öte yandan, daha önce iskemik atak ya da iskemik inme geçirmiş olan kişilerin, tekrar Sİ yaşama olasılığı daha yüksektir (42, 43).

Kesinleşmiş faktörler arasında hipertansiyon, diyabet, hiperinsülinemi ve glukoz intoleransı gibi metabolik bozukluklar yer alırken, kardiyak patolojiler, hiperlipidemi ve sigara kullanımı da risk artırıcı unsurlar arasında bulunmaktadır. Ayrıca, asemptomatik karotis stenozu ve orak hücreli anemi gibi durumlar da bu faktörler arasında sayılmaktadır (42, 43).

Kesinleşmemiş Faktörler ise daha belirsizdir ve bireyler arasında değişkenlik gösterebilir. Alkol kullanımı, obezite, beslenme alışkanlıkları, fiziksel inaktivite gibi yaşam tarzı faktörleri risk oluşturabilir. Ayrıca, hiperhomosistinemi, ilaç kullanımı ve bağımlılığı, hormonal tedavi, fibrinojen düzeyleri ve inflamasyon gibi biyolojik faktörler de bu grupta yer almaktadır (42, 43).

Patofizyolojisi

Sİ, beynin oksijen ve besinlerden yoksun kalması sonucu gelişen ve beyin hücrelerinde ciddi zararlara yol açan bir durumdur. Bu durum, serebral kan akımının %80 oranında azalmasıyla karakterize edilir. Sİ, motor koordinasyonda bozukluklar ve duyu kayıpları gibi semptomlarla kendini gösterebilir. Beyne ulaşan kan akışının azalması, beyin hücrelerinin işlevlerini tam olarak yerine getirememesine sebep olur (44, 45).

Serebral kan akışındaki azalma olmasının sonucunda nöronların işlevlerinde bozulmalar meydana gelmektedir. Serebral kan akışının %20 seviyelerine düşmesi nedeniyle, canlı hücreler oksijen ve glikoz ihtiyaçlarını karşılayamaz hale gelir. Bunun yanı sıra, nöronların işlevlerinin bozulması sonucu iyonik denge bozulur ve hücrelerin enerji ihtiyacı karşılanamaz. İskemik hasar meydana geldiğinde, beyne ulaşan kan akışında azalma olur (46). Beyne giden kan akımının azalması, nöronların geri dönüşü olmayan hasarlarla karşılaşmasına neden olmaktadır (47). Beyin dokusuna kan akışının engellenmesi, nöronların metabolik fonksiyonlarının aksamasına ve oksijen eksikliği gelişmesine sebep olur. Bu oksijen yetersizliği, beyin hücrelerinde çeşitli zincirleme mekanizmaların tetiklenmesine yol açar ve beyinde infarkt alanı (dokunun zarar gördüğü bölge) oluşur (48).

Kaskad mekanizmaların tetiklenmesi, Na^+/K^+ ATPaz pompasındaki işlev bozukluklarından kaynaklanır. Bu bozukluklar, nöron membranının polaritesini bozar ve membranı depolarize eder. Depolarizasyon sonucu, voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır ve

presinaptik Ca^{+2} kanallarının etkinleşmesiyle, eksitatör aminoasitler hücre dışı alana salınır (49).

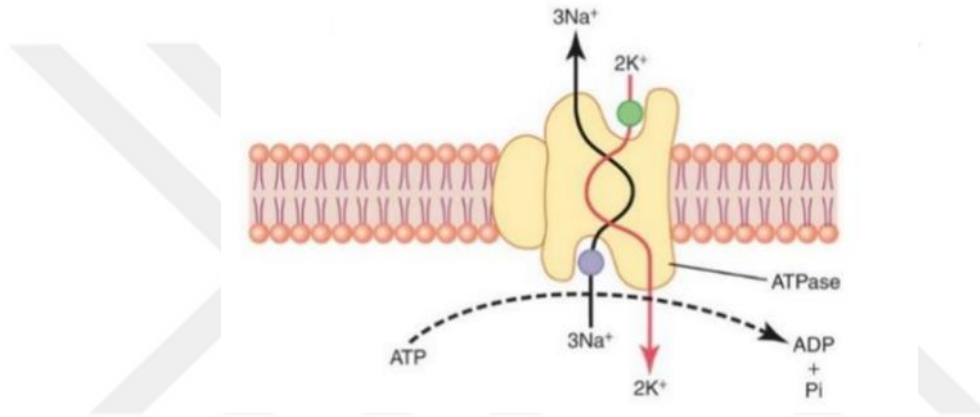
Eksitatör aminoasitlerin post-sinaptik terminalden geri alımı enerji bağımlı bir mekanizmadır. Enerji yetersizliği durumunda bu süreç aksar ve hücre dışına salınan Ca^{2+} iyonları sinaptik aralıkta birikim gösterir. Biriken Ca^{2+} iyonları, post-sinaptik nöronlarda uyarıcı etkiler yaratır. Ayrıca, Ca^{2+} iyonlarının post-sinaptik uçtan geri alımı için glutamatın varlığı gereklidir. İskeminin oluşması, hücre dışındaki glutamatın artmasına neden olur (50).

Glutamat kaynaklı uyarımın gerçekleşebilmesi için, N-metil-D-aspartat (NMDA) ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörlerinin aktivasyonu gereklidir (51). Böylece, iyonotropik NMDA glutamat reseptörlerinin etkinleşmesiyle hücre içine Ca^{2+} iyonlarının girişi artar. NMDA reseptörleri aracılığıyla Ca^{2+} 'nın post-sinaptik uçtan geri alımı, uzun süreli potansiyasyonun tetiklenmesini sağlar. Glutamatın NMDA reseptörleri üzerinden Ca^{2+} alımını artırması, hücrelerin nekroz yönünde hasar görmesine neden olur. Ayrıca, glutamat uyarısı AMPA reseptörleri üzerinden Na^{+} ve Cl^{-} iyonlarının hücre içine girişini kolaylaştırır. Bu iyonların hücre içine girişi, suyun osmotik olarak hücre içine çekilmesine yol açarak beyin dokusunda ödem gelişimine zemin hazırlar (52).

Bunun yanı sıra hücreye yüksek düzeylerde Ca^{+2} akışı Ca^{+2} homeostazının bozulmasına ve eksitotoksisiteye neden olur. Hücre içine NMDA reseptörü kaynaklı Ca^{+2} girişi hücredeki Ca^{+2} 'a bağımlı proteaz, lipaz ve endonükleazları aktive eder. Bu enzimlerin aktivasyonu da hücre iskeleti, hücre zarı ve DNA gibi hücrel bileşenlerin ve dolayısıyla hücrel fonksiyonun bozulmasına neden olur (53). Meydana gelen bu mitokondriyal disfonksiyon hücrel işlevlerin kaybedilmesine ve nöronal hasara yol açar. Sİ/R nedenli nöronal hasarın en yoğun olduğu bölge kor (çekirdek) bölgesidir. Bu bölgeyi çevreleyen alan ise penumbra alanı olarak isimlendirilir (7). Kor bölgesindeki hasar daha fazla kalıcı olurken, penumbra alanında oluşan hasarın hafifleyebildiği ve hücrel faaliyetlerin devam ettiği görülmüştür. Bu sebepten dolayı penumbra alanı, kurtarılabilir bir alan olarak nitelendirilmiş ve çalışmalar için bir hedef haline gelmiştir (8). Bir de bu çalışmalar iskemik hasarın iyileşme sürecinde penumbradaki otofajik ve apoptotik aktivitenin önemli rol oynadığını göstermiştir (54).

Sİ'nin meydana gelmesinin ardından, beyin hücrelerinde bir dizi ölüm mekanizması devreye girer. Eksitotoksisite ve oksidatif stres gibi faktörler, hücrelerin

aşırı uyarılmasına neden olur bunun sonucu olarak da hücreler normal işlevlerini yerine getiremez. Bu süreç, hücre zarının potansiyelinde bozulmalara ve hücre içindeki kalsiyum iyonlarının aşırı birikimine sebep olur. Aşırı Ca^{+2} birikimi, hücrelerin zarar görmesine ve sonunda nekroz adı verilen kontrollü olmayan bir ölüm biçimine yol açabilir. Bunun yanı sıra, hücreler bazen daha kontrollü ve programlanmış savunma mekanizmaları devreye sokarak, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ve otofaji (zarar görmüş hücresel yapıların yok edilmesi) gibi süreçlerle hayatta kalmaya çalışır. Bu mekanizmalar, hücrenin bütünlüğünü korumak amacıyla zarar görmüş yapıları temizlemeye yönelik bir savunma stratejisi olarak işlev görür (Şekil 2.3) (55).



Şekil 2.3. Na⁺/K⁺ Pompasının işlevinde bozulma

Apoptoz

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Başlıca hücre büyüme ve gelişimini düzenleyen, aynı zamanda çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayan temel bir mekanizmadır (55). Apoptoz, dokulardaki hücre sayısının dengede tutulmasını sağlayan bir homeostatik mekanizmadır (56). İskemi gibi birçok nörolojik hasarın patofizyolojisinde de bu mekanizma rol oynamaktadır. Bu süreç, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler arasındaki sinyal iletimleriyle düzenlenir. Pro-apoptotik genler, hücre ölümünü teşvik eder. Anti-apoptotik genler ise bu süreci engellemeye çalışır. Bu dengenin bozulması, hücre ölümünün ya da hayatta kalmasının belirlenmesinde önemli bir rol oynar ve nörolojik hasarların ilerlemesiyle doğrudan ilişkilidir (57).

Araştırma bulguları, iki ana apoptotik yolun mevcut olduğunu ortaya koymaktadır. Bunlardan ilki, ekstrinsik yol olarak bilinen ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen yoldur. İkincisi ise intrinsik yol olarak adlandırılır ve mitokondriyal süreçlere dayalıdır. Bu iki yol, hücre ölümünü tetikleyen farklı mekanizmaları içerir ve her biri belirli sinyal

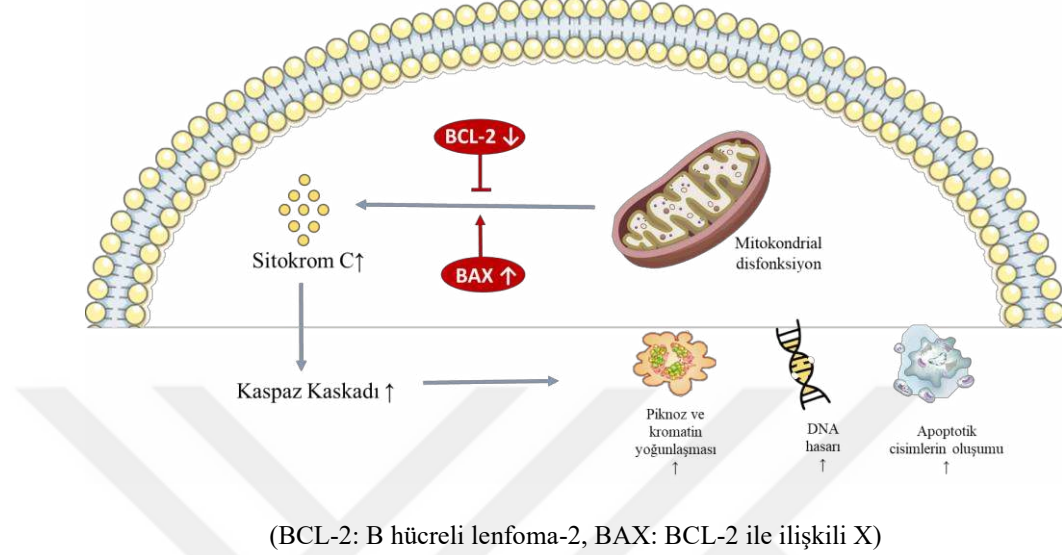
yolları ve protein etkileşimleri ile düzenlenir (58). Mitokondri stabilitesinin bozulması, içsel uyarıları tetikleyerek bazı sinyal yollarını aktive eder. Aynı zamanda, hücre zarındaki ölümle ilişkili reseptörler, örneğin TNF, Fas/CD95 ve TRAIL, uyarılarak dışsal (ekstrinsik) sinyal mekanizmalarını başlatır. Bu süreçler, hücre ölümünü tetikler (59). Sİ sırasında, ekzitotoksisite nedeniyle NMDA ve AMPA reseptörlerinin aşırı uyarılması, hücrede fazla Ca^{+2} birikimine yol açar ve bu da çeşitli sinyal yollarını tetikler (60). Mitokondriyal (intrinsik) yolla gerçekleşen hücre ölüm süreçleri, Beclin-2 (BCL-2) protein ailesi tarafından kontrol edilmekte ve düzenlenmektedir. Bu aile, hücre ölümünü tetikleyen ve engelleyen proteinleri içerir ve mitokondriyal membranın geçirgenliğini etkileyerek apoptotik süreci başlatır. BCL-2 protein ailesinin bazı üyeleri hücreyi apoptoza karşı koruyan anti-apoptotik etki gösterirken, diğer üyeleri pro-apoptotik özellikleriyle hücre ölüm sürecini başlatıcı yönde rol oynamaktadır (61).

Mitokondri membranında yer alan BCL-2 (B hücreli lenfoma-2) ailesinin bazı üyeleri, BCL-2, Bcl-XL, Bclw gibi anti-apoptotik proteinler, mitokondriyal membranın bütünlüğünü korumaya yardımcı olurken; BAX (BCL-2 ile ilişkili X), BAK, BAD, BİM, BİD gibi pro-apoptotik proteinler, membranın parçalanmasına neden olur. Anti-apoptotik proteinler, mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırarak sitokrom C salınımını tetikler (62).

Sitokrom C salınımı, hücre içine giren Ca^{+2} iyonları ile başlar. Bu iyonlar, mitokondri membranında bulunan anti-apoptotik BCL-2 proteinini parçalayarak pro-apoptotik BİD'i aktive eder. Aktive olan BID, BAD ile etkileşime girerek mitokondriyal membranda por oluşumuna neden olur. Bu porlar aracılığıyla mitokondriden sitokrom C ve çeşitli apoptoz indükleyici faktörler salınır. Sitoplazmaya geçen sitokrom C, apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksinin oluşumunu sağlar. Apoptozom, yürütücü kaspazlardan biri olan kaspaz-3'ü aktive ederek DNA hasarı ile sonuçlanan apoptoz sürecini başlatır (63).

Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri aracılığıyla aktive olan bir süreçtir ve bu yolakta en önemli rolü TNF ailesi üstlenir. Hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine TNF ailesine ait bir ligandın bağlanması, mitokondri aracılı bir yol gereksizdir kaspazların doğrudan aktive edilmesine neden olur. Bu bağlanma, kaspaz kaskadının başlatılmasına yol açar ve sonuç olarak kaspaz 8 ve kaspaz 10 gibi ilk kaspazlar aktive olur. Ardından, bu aktif kaspazlar kaspaz-3'ü etkinleştirir. Kaspaz-3 proteaz enzimi, mitokondri membranının bütünlüğünü bozarak hücredeki DNA üzerinde ciddi hasarlara

yol açar. Sonuç olarak, bu süreç apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümüne neden olur ve hücrenin yapısal bütünlüğü bozulur. Bu mekanizma, vücutta gereksiz ya da hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması için önemli bir savunma mekanizması olarak işlev görür (64). Sİ’de apoptozun seyri Şekil 2.4’te gösterildi.



Şekil 2.4. Sİ’de apoptozun seyri (65).

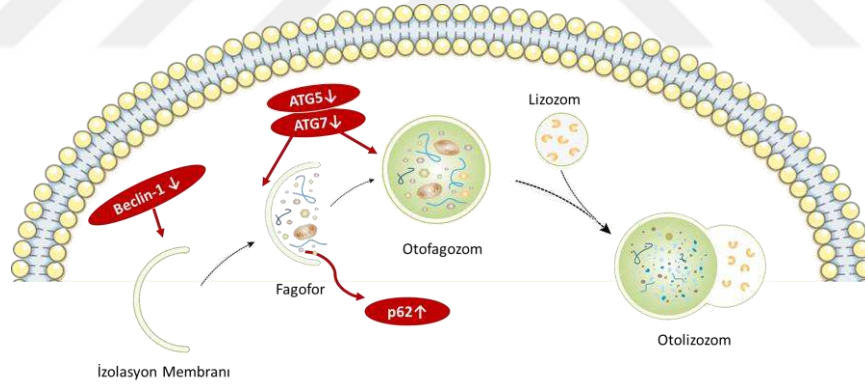
Otofaji

Otofaji (otofagositoz), Yunanca “kendisini yemek” manasına gelmektedir. Yanlış katlanmış proteinler ve hasarlı organeller sitoplazmik molekülleri lizozomal degradasyona yönlendirir. Yani otofaji hücreleri gereksiz stres ve uyumsuz hücre sinyallerinden muhafaza eden hücre düzeyinde savunma mekanizmalarından biridir (66). Otofaji, hücrenin yenilenme ve homeostazın sağlanmasında görev alan; yapı taşları ile enerji üretimini destekleyen dinamik bir yeniden kullanım mekanizmasıdır (67). Hücre içinde yıkım, üretim ve hücre içi maddelerin geri dönüşümünü düzenleyen otofaji mekanizmasının tanımlanması 1960’lı yıllara kadar uzanır. Ancak, otofajinin genetik temellerini anlamaya yönelik araştırmalar 1990’ların ortalarına kadar yapılmamıştır. 1992 yılında Ohsumi ve ekibi, mayalar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda otofaji ile ilgili 30 farklı ATG (autophagy-related) genini tanımlamışlardır. Bu keşif, otofajinin genetik yapısının anlaşılması açısından önemli bir kilometre taşı olmuştur (68).

Otofajide yer alan proteinler, ilk olarak mayalar üzerinde yapılan araştırmalarla bulunmuş ve ardından ökaryotlarda gerçekleştirilen çalışmalarla bu proteinlerin benzerleri tanımlanmıştır (69). Otofaji sürecine katılan üç ana protein Beclin-1, LC3 ve p62’ dir (70). Beclin-1, hücrede birden çok işlevi olan önemli bir moleküldür. Beclin-1, otofajinin başlatılması ve ilerlemesi, endositoz, strese karşı yanıt, yaşlanma ve hücre

ölümü gibi birçok hücresel süreçte kilit rol oynamaktadır. Beclin-1 hücrede çok işlevi olan özel bir moleküldür (71). Kısacası, Beclin-1 otofajinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan temel proteinlerden biri olup, bu sürecin dinamikliğini yansıtan anlamlı bir gösterge olarak kabul edilir (72, 73).

LC3 proteini, Neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) proteini ve p62, otofagozomun gelişim sürecinde, hücre içindeki organellerin ile proteinlerin taşıma ve paketlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu proteinler, hücre içinde hasar görmüş veya işlevini yitirmiş yapıları tanıyarak, otofaji süreci için gerekli olan organellerin ve proteinlerin doğru bir şekilde kargolanmasını ve otofagozomlara yönlendirilmesini sağlar. Bu mekanizma, hücrenin hayatta kalabilmesi ve sağlıklı işlevlerini sürdürebilmesi için hayati öneme sahiptir (74). p62, otofajiyle etkili bir şekilde bozulan özel bir substrattır; yani otofaji süreci düzgün bir şekilde başlar ve tamamlanırsa, p62 seviyesi azalır. Hücre içindeki p62 miktarı, otofajinin etkinliğiyle zıt orantılıdır. Bu sebepten dolayı, hücrede p62 birikimi, otofajik sürecin baskılandığını veya bozulduğunu ifade eden iyi bir gösterge olarak kabul edilir. Bu durum, otofajinin düzgün işleyip işlemediğini belirlemede önemli bir biyomarkerdir (75). Sİ'de otofaji seyri Şekil 2.5'te gösterildi.



(ATG5: otofaji ilişkili gen 5, ATG7: otofaji ilişkili gen 7)

Şekil 2.5. Sİ'de otofaji süreci

2.4. Salusinler

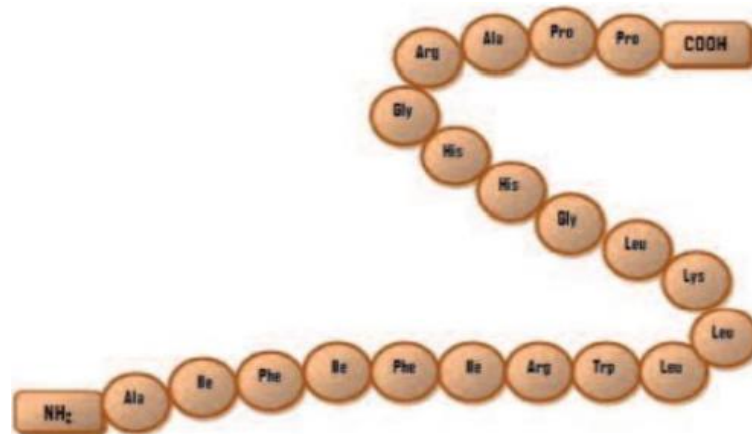
Salusin- α 28 aminoasitten oluşurken Salusin- β 20 aminoasitten oluşan çok işlevli biyoaktif endojen peptidlerdir (76). Salusin'in keşfi, ilk kez 2003 yılında Shichiri ve çalışma arkadaşları tarafından, tam uzunlukta bir cDNA kütüphanesinin in silico analizleri sırasında gerçekleştirilmiştir (15). Hem Salusin- α hem de Salusin- β Torsin Family 2A (TOR2A) geninin alternatif kırılması ile meydana gelen preprosalusin isimli

prekürsörden oluşur. Preprosalusin 242 aminoasite sahiptir, N- terminalindeki 26 aminoasitlik peptidin ayrılması sonucunda 216 aminoasitlik prosalusin meydana gelir. Prosalusin C- terminalinin proteolizi sonrasında da 28 aminoasitlik Salusin- α ve 20 aminoasitlik Salusin- β oluşur (15, 77). Salusinler, böbrekler, damar sistemi, merkezi sinir sistemi, monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere insan, sıçan ve fare gibi farklı hayvan türlerinin çeşitli dokularında sentezlenip eksprese edilen moleküllerdir. Preprosalusin ise özellikle insan damar düz kas hücreleri ve endotel hücreleri gibi damar yapısının önemli bileşenlerinde yüksek seviyelerde üretilip ifade edilmektedir. Bu proteinlerin varlığı, vücutta çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlendiklerini göstermektedir (15).

2.4.1. Salusin- β

Salusin- β , 20 aminoasitten oluşan ve preprosalusin öncüsünden türeyen peptid yapısında bir hormondur (15, 78). Salusin, farklı doku ve organlarda sentezlenmekte olup, merkezi sinir sistemi başta olmak üzere çeşitli bölgelerde bulunması doğrulanmıştır (79).

Yapılan biyokimyasal çalışmalar, Salusin- β 'nin toplam 20 amino asitten oluşan peptid yapısına sahip bir hormon olduğunu ortaya koymuştur. Bu peptidin yapısı, prolin, alanin, lizin, histidin, triptofan, lösin, arjinin, fenilalanin, izolösin ve glisin gibi amino asitlerin birleşiminden oluşmaktadır. Salusin- β , amino terminalinde (NH_2) alanin ile başlayıp, karboksil terminalinde (COOH) prolin ile sona eren bir zincir yapısına sahiptir (Şekil 2.6) (79).



Şekil 2.6. Salusin- β 'nin amino asit dizilimi (79).

Salusin- β 'nin intravenöz uygulanmasıyla birlikte bradikardi ve ani gelişen hipotansiyonun ortaya çıktığı rapor edilmiştir (80). Salusin- β hipotansiyona neden olan bir peptittir ve bu hipotansiyonu vazodilatasyon oluşturmada yapar (81).

Bu peptit, kolinerjik sistem yoluyla antiadiposit etkisini gösterirken, kardiyomiyosit büyümesini inhibe ederek hipotansiyon, bradikardi ve kardiyak disfonksiyon gelişimine yol açar (82, 83).

Yapılan bir çalışmada beynin epitel hücre tabakasının Salusin- β 'yi sentezlediği immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir (17).

Salusinlerin inflamasyon ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkisinin incelenmesine yönelik çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Behçet ve Psoriasis hastalığı olanlarda serum Salusin- β düzeyleri yüksek bulunmuştur (84). Bir *in vitro* çalışmada tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve lipopolisakkarit ile uyarılması sonucu monosit/makrofaj hücrelerinden Salusin- β salınımını indüklediği gösterilmiştir (85). *In vitro* çalışmalarda Salusin- β 'nin NF- κ B aktivasyonu ile inflamasyonu artırdığı bildirilmiştir. Multiple Skleroz (MS) hastalığında nörodejeneratif süreçte proinflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin arttığı gösterilmiştir. Bu süreçte sitokin salınımının NF κ B sinyal yolu üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan çalışmada, Salusin- β düzeyleri MS hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (21).

Salusin- β 'nin vücuttaki hem nöronal proliferasyonu, nörojenezi artırıcı ve nöroinflamasyonu azaltıcı hem de Sİ/R nedenleri arasında yer alan metabolik parametreleri iyileştirici rolleri, Sİ/R hasarını hafifletebileceğini akla getirmektedir. Yapılan bir çalışmada Salusin- β verilen Parkinson hastalığı olan farelerin tedavi edilmemiş Parkinson hastalığı farelere kıyasla telde asılı kalarak daha fazla zaman geçirdiğini göstermişlerdir. Parkinson hastalığı oluşturulan fare modelinde Salusin- β 'nin intranasal olarak uygulanması, dopaminerjik nöronların nöroproteksiyonunu gösterdi ayrıca beyin ortası dopamin nöronlarının sağkalımını artırdı. Bu sonuçlar Salusin- β 'nin Parkinson hastası farelerinin motor fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermiştir ve Salusin- β 'nin Parkinson hastalarının tedavisi için terapötik bir ilaç olarak geliştirilebileceğini düşündürmüştür (20).

Salusin- β damar yapısındaki düz kas hücrelerinin ve fibroblastların çoğalması için uyarı oluşturur, c-myc ve c-fos gibi genlerin üretimini artırır. Oluşan bu olay aterosklerozda tanımlayıcıdır. Salusin- β , aterosklerotik süreci uyarır, endotelial hücre

inflamasyonunu indükler ve bunların sonucu olarak endotel disfonksiyonuna yol açar (86).

Salusin- β 'nin ratlarda koroner iskeminin sebep olduğu miyokard enfarktüsüne sebep olduğu gösterilmiştir (87). Yapılan invitro deneylerde Salusin- β 'nin NF-kB sinyalleri ile VCAM-1, ICAM-1, selektinler, MCP-1, IL-1 β ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz-2 dahil proinflamatuvar moleküllerin ekspresyon seviyelerini, oksidatif stresi ve insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) THP-1 monosit yapışmasını arttırdığını göstermiştir (86). Salusin- β 'nin *in vitro* insan vasküler düz kas hücrelerinde ACAT-1 ve VCAM-1 üretimi ile birlikte köpük hücre oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (88).

LDL reseptör geni baskılanmış fare ateroskleroz modelinde Salusin- β 'nin mRNA'sının arttığı dolayısı ile protein sentezinde artışa yol açtığı; Salusin- β 'nin subkutan enjeksiyonu sonrasında bu farelerdeki aterosklerotik plakların genişlediği ve buradaki lipid birikimlerini çoğalttığı gösterilmiştir (89). Damar bağlanması ile sıçan karotis arterlerinde intimal hiperplazi oluşturulduğunda Salusin- β 'nin engellenmesi ile bu intimal kalınlaşmada miktar azaldığı gösterilmiştir (88).

Anti-Salusin- β infüzyonu uygulanan sıçanlarda, bu infüzyon uygulanmayan sıçanlara göre anjiyogenez sürecinin daha yoğun şekilde aktive olduğu gözlemlenmiş, ancak vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A) ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. (90).

Yapılan araştırmalarda Salusin- β 'nin mide ve bağırsakta varlığı ortaya konmuştur (15). Yapılan bir çalışmada, etanol ile indüklenen mide hasarı sonrasında Salusin- β uygulamasının etkilerine bakılmıştır ve Salusin- β 'nin oksidatif hasar ve TNF- α seviyeleri üzerindeki etkileriyle kaspaz-3 ekspresyonunu baskıladığı, bu nedenle antiülseratif ajanlar olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. Kaspaz-3 ekspresyonunun baskılanması, Salusin- β 'nin, ülserleşmiş dokularda apoptoz (programlanmış hücre ölümü) sürecini azaltabileceğini gösterir. Kaspaz-3, apoptozda önemli bir enzim olduğundan, bu enzimin baskılanması, hücre koruyucu bir etkiyi işaret eder. Salusin- β , reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltarak, oksidatif strese bağlı doku hasarını ve apoptozu önleyebilir. Salusin- β , pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α seviyelerini düşürerek, inflamasyonu azaltabilir ve bununla birlikte doku hasarını engelleyebileceği düşünülmüştür (18). Yapılan başka bir çalışmada ise Salusin- β 'nin N-terminal dizelerinin antimikrobakteriyel

etkisinin güçlü olduğu ileri sürülmüştür (91). Literatür verilerine göre Salusin- β uygulamalarının iskemi sonrası kalp dokusunda infarkt alanını azalttığı bildirilmiştir (92).

Yapılan başka bir çalışmada yumurtalık kanseri dokularında Salusin- β ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir ve Salusin- β 'nin yumurtalık kanserindeki prognostik önemini tanımlanmakta, Salusin- β 'nin yumurtalık kanseri için yeni bir prognostik biyomarker olabileceğini düşündürmektedir (93).

Böbrek dokusunda varlığı tespit edilmiş (37) olan Salusin- β 'nin iskemik reperfüzyonlu böbrekte etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, süperoksit dismutaz (SOD) ve plazma glutatyon ve eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-PX) enzim aktivitelerini artırdığı buna karşılık malondialdehit (MDA), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-1 (IL-1B) seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Salusin- β 'nin iskemiye uğramış böbrekte kreatinin (Cre) düzeyini düşürerek böbrek iskemi hasarına karşı koruyucu rol oynadığı ileri sürülmüştür (25).

Salusin- α ve Salusin- β 'nin böbrekler de dahil olmak üzere birçok dokuda, insanlarda ve sıçanlarda gösterilmiş olmasına rağmen (15, 94) Sağlıklı insanların serum ve idrarında Salusin- α ve Salusin- β 'nin normal seviyeleri bildirilmiştir (95). Böbreklerdeki hasarlı tübüller ve endotel hücreleri TNF- α , IL1 β ve IL-6 dahil olmak üzere sitokinler üretir. Salusin- β 'nin iskemik reperfüzyonlu böbrekte etkilerinin incelendiği başka çalışmada, Salusin- β uygulamasının proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL1 β ve IL-6 seviyelerini normale döndürdüğünü bulunmuştur. Bu çalışmada, I/R grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun arttığını, Salusin- β uygulamasının ise inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle, Salusin- β 'nin TNF- α , IL1 β ve IL-6'nın yükselmiş seviyelerini ve böbrekte kreatinin (Cre) düzeyini düşürdüğü dolayısıyla böbrek iskemi hasarına karşı koruyucu rol üstelenebileceği ileri sürülmüştür (22).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyin Yapıldığı Merkez

Çalışmadaki uygulamaların tamamı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca 06.01.2022 tarihinde yapılan toplantı sonucu 2022/1-4 sayılı kararı ile onaylanan ve 13242 HAYBİS kayıt numaralı etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı. Çalışmada *Sprague Dawley* ırkı, ortalama ağırlıkları 250-300 g ağırlığında, 3 aylık toplam 27 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince tüm sıçanlar sıcaklığı $21\pm2^{\circ}\text{C}$ de sabit tutulan ortamda barındırıldı. Sıçanların bulunduğu ortam için 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü uygulandı. Hayvanlara *ad libitum* olarak beslenmeleri için pellet halindeki standart sıçan yemi, su ihtiyaçları için ise normal musluk suyu verildi. Çalışma süresince deney hayvanlarının beslenme ve bakımı, Sİ modelinin oluşturulması, nörolojik muayeneleri, rotarod ve yapışkan çıkarma davranış testleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde (İNÜTF-DEHÜM), 2,3,5-trifenil tetrazolium klorür (TTC) Boyama ve Western Blot analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak sıçan sayısı <http://biostatapps.inonu.edu.tr/> yazılım sistemi kullanılarak (I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.8, etki büyüklüğü 0.88 ve alternatif hipotez (H1) iki yönlü iken bu test kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü her grupta 9 olmak üzere toplamda 27 olmalıdır.) hesaplanmıştır.

3.3. Deney Hayvanlarının Rasgele Gruplara Yerleştirilmesi

Mevcut tez proje çalışmasında taraf tutma (yanlılık) problemlerini en aza indirmek için rasgele atama ve çift körleme yöntemleri kullanıldı. Bu bağlamda, deney hayvanlarının bu tez çalışmasında incelenen deney ve kontrol gruplarına yerleştirilmesi rasgele atama (randomizasyon) yöntemlerinden rasgele tahsis kuralı kullanılarak Fakültemiz Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen rasgele atama yazılımı ile yapıldı.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Tasarımı

Çalışmaya dahil edilen tüm sıçanlar Kontrol, Sİ/R, Sİ/R+Salusin- β olmak üzere rastgele atama yöntemiyle 3 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu: Bu grupta bulunan hayvanlara üç gün ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Testlerin tamamlandığı ertesi günü bu gruba ait hayvanlara sadece KKA (kommon karotid arter), IKA (internal karotid arter) ve EKA (eksternal karotid arter) izolasyonu ile cerrahi operasyon taklidi yapıldı fakat OSA damarının oklüzyonu yapılmadı. Bu cerrahi operasyonu takip eden üç günde de nörolojik defisit skorlama (NDS), rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Üçüncü gün o güne ait tüm davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2,) ve otofajik (Beclin-1, ATG5 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

2. Sİ/R Grubu: Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Bu testlerin ertesi günü bu gruba ait hayvanlara Sİ/R yapıldı ve bu cerrahi operasyonu takip eden üç günde de NDS, rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Üçüncü gün o güne ait tüm davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

3. Sİ/R+Salusin- β (300 nM): Bu gruptaki hayvanlara üç günlük ön/alıştırma davranış testleri yaptırıldı. Bu testlerin ertesi günü bu gruba ait hayvanlara Sİ/R yapıldı ve R'dan bir saat sonra her hayvan için 300nM olacak şekilde 3 gün boyunca intranazal olarak Salusin- β uygulandı. Bu cerrahi operasyonu takip eden 3 günde de nörolojik defisit skorlama (NDS), rotarod ve kavrama gücü testleri yaptırıldı. Üçüncü gün o güne ait tüm davranış testleri tamamlandıktan sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularında TTC boyama yöntemi ile infarkt alan hesaplandı. Western Blot yöntemi ile de apoptotik (BCL-2 ve) ve otofajik (Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi.

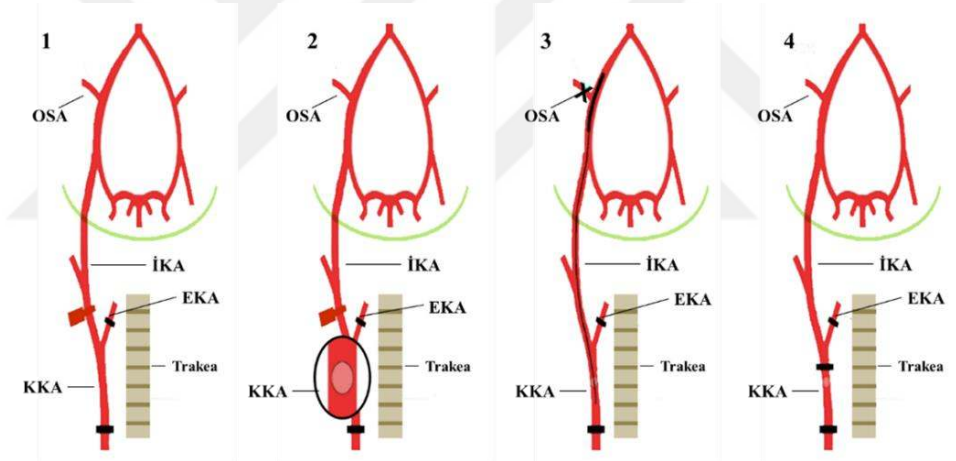
3.5. Hayvanların Anesteziye Alınarak Cerrahi Operasyonlara Hazırlanması

Sıçanlar intramüsküler yolla 70 mg/kg ketamin, 8 mg/kg uygulanması ile anestezi altına alındı daha sonra sıçanların parmak kısırtma yanıtlarına bakılarak anesteziye girip

girmediğ değerlendirildi. Anesteziye girmiş olarak belirlenen hayvanların boyun bölgesindeki yaklaşık 3x4 cm²'lik alan tıraş edildi ve cilt görünür hale getirildi. Görünür hale getirilen bölge povidon iyot solüsyonu ve %70'lik etanol ile dezenfekte edilerek cerrahi işlemlere başlandı.

3.6. Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması

Hayvanların cerrahi operasyonlarına anestezi uygulaması tamamlandıktan ve hayvanlar tamamen anesteziye girdikten sonra başlandı. Hayvanların uyarılara yanıtız ve deney esnasında rutin solunumlarına devam ediyor olması dikkate alındı. Deney boyunca hayvanların vücut sıcaklıkları 36.5-37 °C'de sabit tutulacak şekilde kontrol edildi. Fokal Sİ modeli Koizumi intraluminal filaman tekniği kullanılarak sağ orta serebral arterin oklüzyonu (OSAO) ile oluşturuldu. Modelin şematik gösterimi şekil 3.1'de yer almaktadır.



KKA: kommon karotid arter, EKA: eksternal karotid arter, İKA: internal karotid arter, OSA: orta serebral arter, 1: KKA ve EKA'daki kan akışı tamamen kesilir ve İKA klemplenir, 2: KKA'da küçük bir kesi açılır, 3: İKA klempini açarak KKA'da açılan kesi içerisinden İKA boyunca OSA'ya ulaşana dek ucu silikonlu naylon ip gönderilir ve OSA kan akışı kesilir, 4: ucu silikonlu naylon ip çıkarılarak reperfüzyon sağlanır.

Şekil 3.1. Deneysel Sİ/R modelinin şematik gösterimi

Model oluşturulurken, hayvanlar sırtüstü pozisyonda yatırıldı orta hattın 5-6 mm sağına 3-4 cm uzunluğunda cilt üzerinden vertikal yönde kesi yapıldı. Bu kesi ile süperfisyel fasyaya ulaşılarak altında yer alan sternohyoid, digastrik ve sternomastoid kaslarına ulaşıldı. Bu kasların daha derininde kalan sağ KKA, İKA ve EKA kendilerini çevreleyen vagus siniri ve dokulardan izole edilerek ortaya çıkarıldı. Kontrol grubunda bu aşamadan sonra açılan kesi bölgesinden dikişler atıldı. Dikiři takip eden 1 saatin

sonunda bu gruba ait hayvanlara intraperitoneal yolla 1 ml %0,9'luk izotonik sodyum klorür çözeltisi (serum fizyolojik solüsyon) verildi.

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

Ucu silikonlu Naylon ip 90 dk boyunca damar içerisinde bekletilerek OSAO sağlandı ve ilgili bölgede serebral kan akışı kesildi. Bu sürede hayvanlar ısı minderi üzerinde bekletilerek rektal prob yardımıyla vücut sıcaklıkları korundu. Doksan dakikanın sonunda ucu silikonlu naylon ip geri çekilerek reperfüzyon sağlandı.

90 dakika sonunda anestezi etkisi geçen hayvanlara ek anestezi yapıldı. Hayvanlar anestezi altındayken dikişler atıldı ve uyandıklarında kafeslerine alındı. Reperfüzyondan 1 saat sonra hayvanlara intraperitoneal yolla 1'er ml (gruplarına göre) serum fizyolojik ya da intranazal olarak Salusin-β verilerek cerrahi işleme son verildi.

3.7. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri

3.7.1. NDS Testi

NDS testi, Bederson skorlama metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Hayvanların nörolojik durumlarının gözlemlenmesi (Şekil 3.2) Reperfüzyon başladıktan 24 saat sonra gruplardaki tüm hayvanlara uygulandı. Modifiye edilmiş Bederson skorlama metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.1. Bederson skorlama metoduna göre nörolojik duruma karşılık gelen puan sistemi

Puan	Nörolojik Durum
0 Puan	Sağlıklı norolojik durum (defisit yok)
1 Puan	Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında kontralateral ön ayakta fleksiyon,
2 Puan	Kontralateral ön ayakta fleksiyon ve lateral itmeye karşı azalmış direnç
3 Puan	Yürürken kontralateral yöne doğru daire çizme
4 Puan	Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında dönme hareketi veya nöbet aktivitesi
5 Puan	Spontan olarak yürüyememe



Şekil 3.2. Hayvanların nörolojik durumun gözlemlenmesi

3.7.2. Rotarod Testi

Rotarod cihazı kendi etrafında dönen ve 4 kulvarlı silindir bir banttandır. Bu bantın dönüş hızı, ivmesi ve süresi ayarlanabilmektedir. Bu test ile dönen bir bant üzerine yerleştirilmiş hayvanın düşmeden kalabildiği süre ölçülerek hayvanların cerrahi işlemler ve Sİ sonrası denge motor koordinasyonu değerlendirildi. Tüm gruptaki hayvanların cihaza ve teste alışabilmesi için cerrahi operasyonları öncesinde 3 gün boyunca her birine 900 saniye (15 dakika) süresince 5 rpm'de (Şekil 3.3.) ön alıştırma uygulamaları yaptırıldı. Testlere cerrahi operasyonun ertesi günü başlandı ve 3 gün boyunca her gün aynı saatlerde yaptırıldı. Gruptaki tüm hayvanlar bireysel bölmelerine dönen çubuğun tersi yönünde yerleştirildi (Şekil 3.3). Akabinde

rotarod cihazı 300 saniye (5 dakika) içerisinde 4 rpm'den 40 rpm'ye çıkacak şekilde ayarlandı (Şekil 3.3) ve sıçanların bu ivmeli harekette dönen bandın üzerinde kalabildiği süre ölçüldü. Bu ölçüm her bir sıçan için 5 dakika aralıklarla 3 kez tekrarlandı. Günlük tekrarlı ölçümlerin ortalaması alınarak ve günler arası karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.3. Rotarod cihazının ayarlanması ve hayvanların yerleştirilmesi

3.7.3. Yapışkan Çıkarma Testi

Yapışkan çıkarma testi hayvanlardaki somatosensoriyel duyarlılığı ölçer. Bu test hayvanların cerrahi operasyonlarından sonraki duyuusal durumlarını incelemek için tercih edilen bir yöntemdir. Testi yapmak üzere her hayvanın sol ön ayağının (Sİ modeli sağ OSAO ile oluşturulduğu için) distal radial yüzüne eşit boyutlarda kesilmiş (1x1 cm²) yapışkan etiketler yapıştırıldı ve hayvanın yaptığı temizleme hareketiyle bu etiketi çıkartması beklendi. Bu süreçte kronometre ile süre tutularak hayvanın davranışları gözlemlendi. Etiket hissederek temizlemeye başladığı ilk an (saniye cinsinden) not edildi. Her bir etiket süresi en fazla 120 saniye ile sınırlandırıldı. Tüm hayvanlara cerrahi operasyonlardan önce 3 gün boyunca günde 1 kez yapışkan testi alıştırması yapıldı. Cerrahi operasyonların ertesi gününden itibaren yani Reperfüzyon sağlanmaya başladıktan 24 saat sonra 3 gün boyunca her gün aynı saatlerde günde 1 kez her hayvana yapışkan testi yapıldı ve hayvanların yapışkanı çıkartabildiği süre kaydedildi. Her bir hayvan için tüm testler gün-gün karşılaştırıldı.

3.7.4. Kavrama Gücü (Grip Strenght) Testi

Kavrama gücü testi, hayvanların ekstremitte kuvvetlerini Newton-metre cihazı (Güç Mukavemet Test Cihazı) ile ölçmek için kullanılan bir testtir. Bu ölçüm ile hayvanların nöromotor durumları değerlendirilir. Değerlendirmede standardizasyonu sağlamak için tüm hayvanlar kuyruklarının tabanından çubuğun yukarısına doğru tutuldu ve aşağı doğru hareket ettirilerek çubuğun ortasından iyice kavraması sağlandı. Gövde ve alt ekstremiteler yere paralel (yatay) bir biçimde tutularak hayvan kavradığı cihaz çubuğunu bırakana kadar çekildi, bıraktığında tamamlandı. Bu işlem her hayvanın her testinde aynı şekilde gerçekleştirildi ve hayvan cihaz çubuğunu bırakmadan hemen önceki en büyük değer hayvanın güç değeri kabul edildi.

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

3.8. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması

Üçüncü gün davranış testleri tamamlandı ve daha sonra hayvanlar dekapite edildi. Dekapitasyon işleminden sonra kafatası üzerindeki deri ve kas tabakaları makasla kesildi ve foramen magnum ortaya çıkarıldı. Sağ ve sol taraflardan foramen magnumun içine makasın bir ucu ile girilerek kafatası kemiği kesildi. Bu aşama gerçekleştirilirken beyine dokunmamaya dikkat edildi. Kesilen kafatası kemiği aynı dikkatle pens yardımıyla kaldırılarak beyinle bağlantısı (meninges zarı) kesilerek beyinden ayrıldı ve yerinden çıkarıldı. Ardından ucu künt bir pens ile optik ve trigeminal sinir bağlantıları kesilerek beyin bulunduğu yerden çıkarıldı. Beyin dokusunun alınması işlemi olabildiğince hızlı ve

özenli gerçekleştirildi. Alınan beyin dokuları analizlerin yapılacağı zamana kadar uygun muhafaza koşullarında (-80 °C'de) muhafaza edildi.

3.9. Analizlerin Yapılması

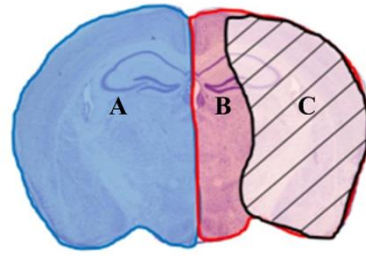
3.9.1. TTC Boyama ile Beyin İnfarkt Alanının Gösterilmesi

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

Davranış testleri tamamlanmış sıçanların dekapitasyonu ile alınan beyin dokuları kuru buz üzerinde donduruldu. Kesitler bregmanın +4 mm anteriyoru ve -6 mm posteriyoru aralığında koronal olarak 2 mm aralıklarla 6 dilim kesit alındı. Alınan kesitler içerisinde Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile %1'lik konsantrasyonda hazırlanmış TTC olan petri kabı içerisine alındı.

İçerisinde %1'lik TTC'ye maruz bırakılmış beyin kesitleri olan petri kabı 37 °C'de inkübe olmak üzere etüve alındı. Bu inkübasyon işlemi karanlıkta ve 30 dakika süresince gerçekleşti. Akabinde beyin dilimleri %4'lük ile 12 saat süresince fiks edildi.

Fiksasyon işleminin ardından TTC ile boyanmış kesitlerin fotoğrafları çekildi ve görüntüler bilgisayara aktarıldı. Kesit görüntülerindeki kontralateral hemisferdeki tüm alan (A) ve inspilateral hemisferdeki sağlıklı alan (B) Image J uygulaması kullanılarak belirlendi. Belirlenen bu alanlar ile infarkt alan yüzdesel olarak (%C) şu formülle hesaplandı (Şekil 3.4).

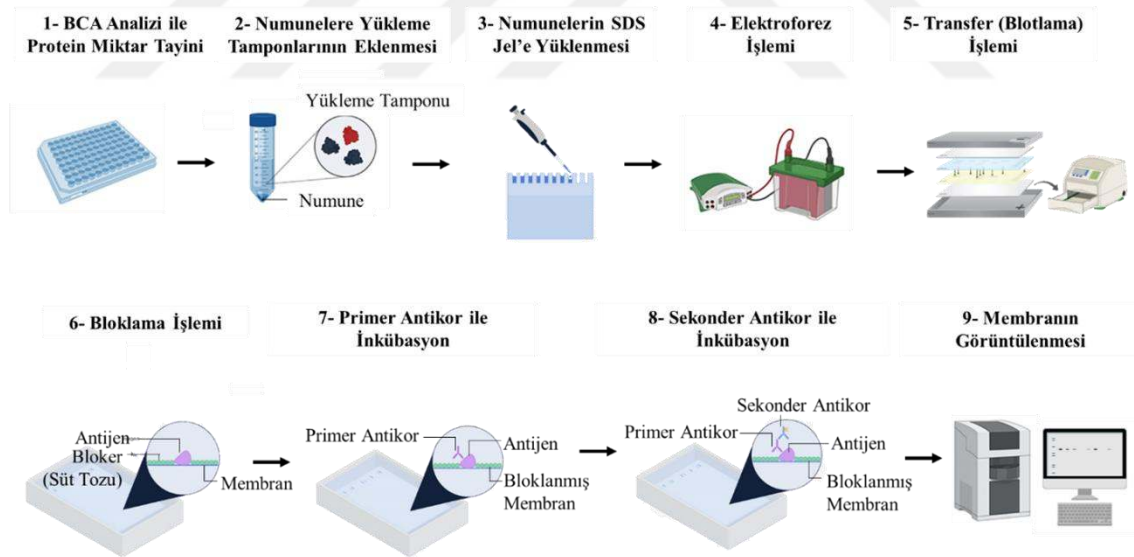


$$\%C = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Şekil 3.4. İnfarkt alanın yüzdesel olarak hesaplanması

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

Western Blot analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bulunan Beyin Araştırmaları laboratuvarında yapıldı. Sıçanların beyin dokularında apoptotik (BCL-2) ve otofajik (Beclin-1, ATG5 ATG7 ve p62) proteinlerin seviyeleri belirlendi. Yapılan Western Blot analizinin genel olarak prosedürü Şekil 3.5'te gösterildi.



Şekil 3.5. Western Blot analizine genel bakış

Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Dekapitasyondan sonra muhafaza edilmek için -80°C'lik dondurucuya alınan beyin dokuları analiz öncesi oda ısısına gelmesi için dondurucudan çıkartıldı. Dokular oda ısısına geldikten sonra her hayvana ait beyin dokusundan 100-150 mg olacak şekilde beyin dokusu hassas terazide tartılarak alındı. Alınan dokulara 10 katı oranında hazırlanan

RIPA Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyl çözeltisinden 1'er ml eklendi ve dokular doku homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi süresince numunelerin düşük sıcaklıkta kalmaları sağlanarak protein yıkımı engellendi. Homojenizasyonun ardından homojenatlar 15 000 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere süpernatant kısımları alındı.

Alınan süpernatantların ihtiva ettiği total protein miktarı tayini Bisinkoninik Asit (BCA) analiz kiti kullanılarak yapıldı. BCA protein miktarı, ticari kit kullanılarak tayin edildi. Öncelikle kit içerisinde bulunan 1 ml hacmindeki, 2 mg/ml'lik Bovine Serum Albümin (BSA) dilüe edilerek çeşitli konsantrasyonlarda BSA standart çözeltileri hazırlandı. Kit içeriğindeki Reaktif A ve Reaktif B 50/1 oranında karıştırılarak çalışma reaktifi hazırlandı.

BSA'nın dilüe edilmesiyle hazırlanan standartlar ve protein konsantrasyonları ölçülmek istenen numuneler 50 µl çift tekrar olacak şekilde mikropilaya kuyucuklarına eklendi. İlâveten kuyucuklara 100 µl çalışma reaktifi ilave edildi. Mikropilaya hafifçe çalkalanarak 37°C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda meydana gelen renk değişiminin absorbansı mikropilaya okuyucuda (Bio-tek, ABD) 562 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ile BSA standartlarının absorbanslarından yararlanılarak konsantrasyon-absorbans grafiğı çizildi ve grafik denklemi belirlendi. Numune absorbansları grafik denkleminde yerleştirilerek her bir numunenin total protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplandı.

SDS Jelin Hazırlanması ve Proteinlerin Elektroferez işlemi

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) jel hazırlanırken kullanılan reaktifler belirtili hacimlerde karıştırıldı. Jel hazırlanırken TEMED ve APS'nin jelin donmasını başlatması özelliğinden dolayı karışıma en son eklenmesine dikkat edildi. İlâveten APS her jel hazırlığında taze hazırlandı. SDS Jel, Running Jel (%10) ve Stacking Jel (%5) adlı aynı reaktiflerin farklı oranlarıyla hazırlanan iki jelden oluşturuldu. Bu iki jelden ilk olarak hazırlanan Running Jel (%10) pipet ile Western Blot jel kasetinin camlarının arasına dökülürken hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edildi ve jelin üst kısmının havayla temasını engellemek için üst yüzeyine izopropanol eklendi. 30-60 dk jelin donması için beklendi. Running Jel (%10) hazırlığında kullanılan reaktifler ve hacimleri Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2. Running Jel (%10) hazırlığında kullanılan reaktifler ve hacimleri

Kullanılan Reaktifler	Hacimleri (1 kaset jel için)
1.5 M Tris HCl (pH 8.8)	1250 µl
Distile Su	2000 µl
% 40'lık Akrilamid/Bis-Akrilamid	1670 µl
% 20'lik SDS	25 µl
%10'luk APS	25 µl
TEMED	2.5 µl

Running Jel (%10) donduktan sonra üst kısımdaki izopropanol döküldü. Ardından Tablo 3.3'te yer alan reaktifler ile belirtilen hacimlerde Stacking Jel (%5) hazırlandı ve hazırlanan jel donmuş Running Jel (%10)'in üzerine döküldü. Ardından her bir kuyucuğun 50 µL hacimli olmasına izin veren 10 kuyucuklu tarak kasetteki camlar arasına, jel üzerine (içine) yerleştirildi. Polimerizasyon işlemi ile jelin donması için jeller 30-60 dk kaset standında bekletildi.

Tablo 3.3. Stacking Jel (%5)'in hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve hacimleri

Kullanılan Reaktifler	Hacimleri (1 kaset jel için)
1. M Tris HCl (pH 6.8)	375 µl
Distile Su	2088 µl
% 30'lık Akrilamid/Bis-Akrilamid	506 µl
% 20'lik SDS	15 µl
%10'luk APS	15 µl
TEMED	1.5 µl

Elektroforez İşlemi

Jele yüklenecek numunelerin her biri için 50 µg protein ihtiva edecek hacim hesaplandı ve elde edilen miktar kadar numune alındı. Alınan numune üzerine %0.05 Bromphenol blue, %30 gliserol, %10 SDS, 0.25 M Tris-HCl, %5 β-merkaptotanol oranlarında hazırlanan Örnek Yükleme Tamponu eklendi. Tamponu oluşturan bileşenlerden β-merkaptotanol tampon içerisine en son (örnek jele yükleneceği zaman) ilave edildi.

SDS deterjanının proteinlere bağlanarak proteinleri negatif yüklü hale getirebilmesi için numuneler 10 dakika boyunca 95 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sırasında jel kasetleri elektroforez tankına uygun bir biçimde yerleştirildi ve jel kasetleri arasına sızdırmamasına dikkat edilerek yürütme tamponu döküldü.

Jel kasetlerine takılmış taraklar çıkarıldı ve yürütme tamponu kuyucukların üzerini geçecek seviyeye gelene kadar eklenmeye devam edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna 3 µl hacminde protein molekül ağırlık markeri (ab116029; Abcam, İngiltere) yüklendi. Diğer kuyucuklara da Örnek Yükleme Tamponu eklenmiş numuneler yüklendi. Yükleme işleminin tamamlanması ardından elektroforez tankı uygun seviyeye kadar yürütme tamponu ile doldurularak güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı 100 voltta 130 dakika süreye ayarlanarak elektroforez başlatıldı. Yükleme tamponu ilave edildikten sonra mavi renk alan numuneler elektroforez sürecinde jeldeki akışları izlendi ve uygun noktada güç kaynağı durdurularak elektroforez aşaması sonlandırıldı.

Transfer (Blotlama) ve Bloklama İşlemleri

Jele yüklenmiş be elektroforezle akışı gerçekleştirilmiş numunelerin membrana transferi için poliviniliden florür (PVDF) yapılı membranlar kullanıldı. Transfer işlemi yapılırken yarı-kuru transfer yöntemi uygulandı.

Blotlamaya başlamadan önce PVDF yapılı membranlar jele uygun ölçülerde kesildi ve çok kısa bir süre (yaklaşık 30-60 sn) metanolde ve 2 dk da transfer solüsyonunda bekletildi. PVDF yapılı membranların transfere hazır hale gelmesi ardından jeller elektroforez tankından çıkarıldı ve ince bir spatula yardımıyla kaset camları birbirinden dikkatlice ayrıldı. Bu aşamada jel kaseti oluşturan iki camdan birinden ayrılırken diğer camın üzerinde kaldı. Jelin üzerinde bulunan fazlalık bölgeler spatula yardımıyla kesilerek atıldı ve jel üzerinde kaldığı camdan distile suyla yıkanarak ayrıldı.

Bu sırada içinde soğuk transfer tamponu bulunan bir kap içerisine blotlama aşamasında kullanılmak üzere transfer kağıtları (whatman kağıtları) konularak soğuk transfer tamponu ile ıslanması sağlandı. Transfer cihazının ilgili bölmesine üst üste iki kat transfer tamponu ile ıslatılmış transfer kâğıdı yerleştirildi. Kağıtlar arasında oluşan hava kabarcıklarını çıkarmak için üzerinden rulo ile geçilerek düzleştirildi. Bu transfer kağıtlarının üzerine PVDF yapılı membran yerleştirildi ve bir kez daha rulo ile düzleştirildi. PVDF yapılı membranın üzerine elektroforez aşaması tamamlanarak kasetten ayrılmış jel yerleştirildi ve üzerine iki adet daha transfer kâğıdı konularak yine hava kabarcıkları rulo yardımı ile çıkarıldı. Transfer cihazının ilgili bölmesi, bu bölmeye

ait özel kapağı ile kapatılarak cihaza yerleştirildi. Cihaz 25 volt 7 dk süreye ayarlandı ve transfer işlemi tamamlandı.

Transfer işlemi ardından membrana geçen non-spesifik bağlanmaları engellemek üzere yapılan bloklama işlemi membranın oda sıcaklığı koşullarında bir çalkalayıcı yardımıyla 1 saat boyunca %5'lik süt tozu ile muamelesi şeklinde gerçekleşti.

Primer Antikor ile İnkübasyon

Primer antikorlar, %5'lik BSA (%0,1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlandı) ile primer antikora özgü kılavuzlarında önerilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Membranlar hazırlanan bu primer antikorlar (ATG5, ATG7, Beclin-1, p62, BAX, BCL-2 ve Cleaved β -Aktin (1:500),) ile +4 °C'de karıştırıcıda bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar 3 defa 10 dk boyunca TBS-T çözeltisi ile yıkandı.

Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Sekonder antikorlar, %5'lik BSA (%0,1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlandı) ile hazırlandı. Primer antikor inkübasyonundan sonra oda sıcaklığında 3 defa 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkanan membranlar yıkamanın ardından tüm primer antikorlar için Anti-rabbit IgG HRP-linked sekonder antikor (1:1000) ile oda sıcaklığında karıştırıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı, Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membranlar yine 3 defa 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı.

Membranın Görüntülenmesi

Sekonder antikor inkübasyonu sonrası 3 kez yıkamanın ardından membran temiz bir pens ile ışık geçirmeyen bir kaba alınarak Western ECL Substrate içerisindeki solüsyonlarının 1/1 oranındaki karışımı (Thermo Scientific, ABD, kat. no:32106) ile muamele edildi. Membran üzerindeki protein bantları Sygene G:BOX görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi. Protein bantları daha sonra Image J (Version 4.03.05, Sygene, Cambridge, İngiltere) yazılımı ile hesaplandı.

3.10. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonunda elde edilen veriler IBM SPSS statistics version 24.0 for Windows paket programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel analiz sürecinde Shapiro Wilk testi kullanılarak elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Analizler Kruskal Wallis H testi ile yapıldı, gruplar arası karşılaştırmalarda önemli farklılık belirlendiğinde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney

U testi kullanıldı. Nicel veriler ortalama değeri $\pm$ standart sapma ile özetlendi ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

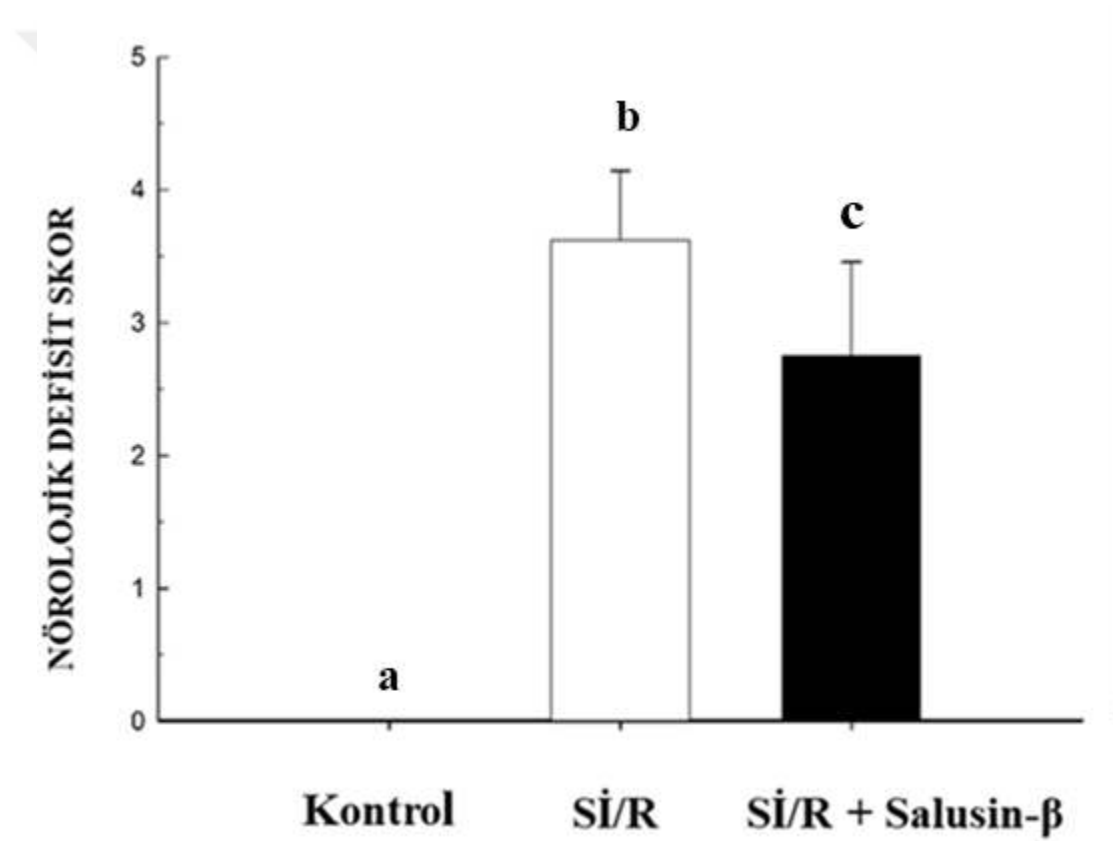


4. BULGULAR

4.1. Salusin- β 'nın NDS ve Davranış Testleri Üzerine Etkisi

4.1.1. Salusin- β 'nın NDS Üzerine Etkisi

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nın Sİ/R modeli oluşturulan gruplarda NDS üzerine etkisi Şekil 4.1'de verildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu skorun Sİ/R grubuna göre Salusin- β uygulanan grupta anlamlı olarak düştüğü belirlendi ($p<0.05$).

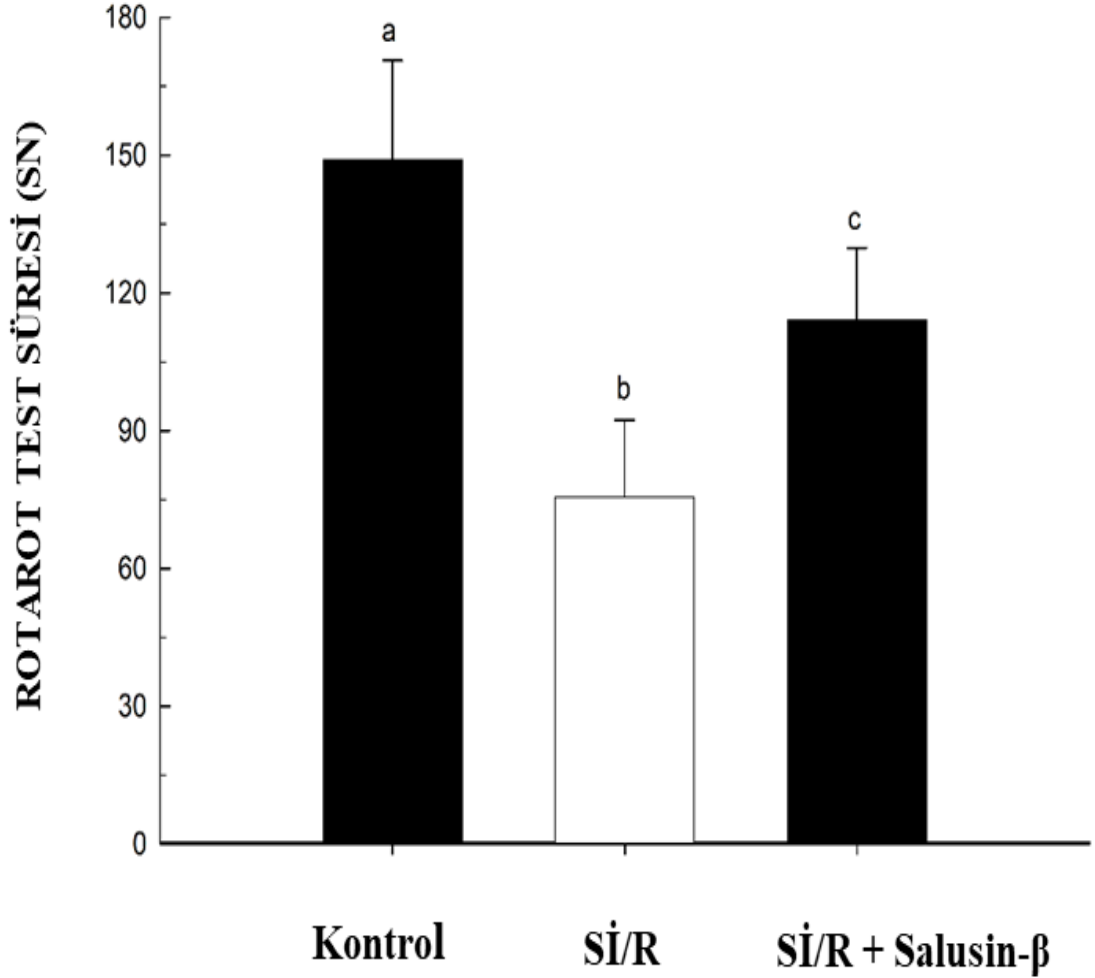


Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermekte, aynı harfler istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmektedir; $a,b,c p<0.05$

Şekil 4.1. Salusin- β 'nın NDS üzerine etkisi

4.1.2. Salusin- β 'nın Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nın rotarod test süresi üzerine etkisi Şekil 4.2'de verildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu sürenin Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdiği ($p<0.05$), Salusin- β grubunda ise Sİ/R grubuna göre artış gösterdiği ve bu artışın anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

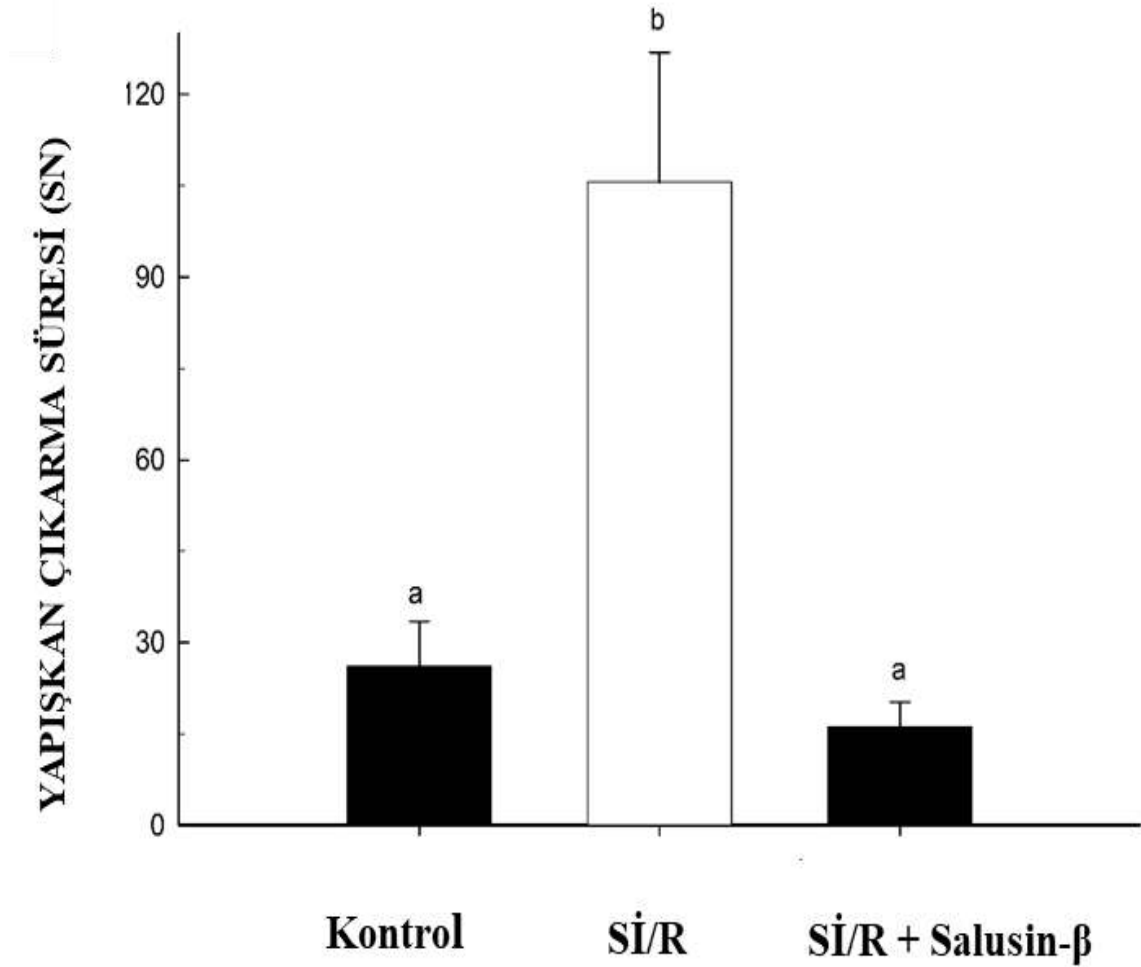


(Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermekte, aynı harfler istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmektedir; $a,b,c,p<0.05$)

Şekil 4.1. Salusin- β 'nın rotarod test süresi üzerine etkisi

4.1.3. Salusin- β 'nın Yapışkan Çıkarma Süresi Üzerine Etkisi

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nın yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi Şekil 4.3'te verildi. Bu süre Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek, Salusin- β grubunda Sİ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşüktü. ($p<0.05$). Salusin- β grubunda kontrol grubuna kıyasla yapışkan çıkarma süresinde azalma görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

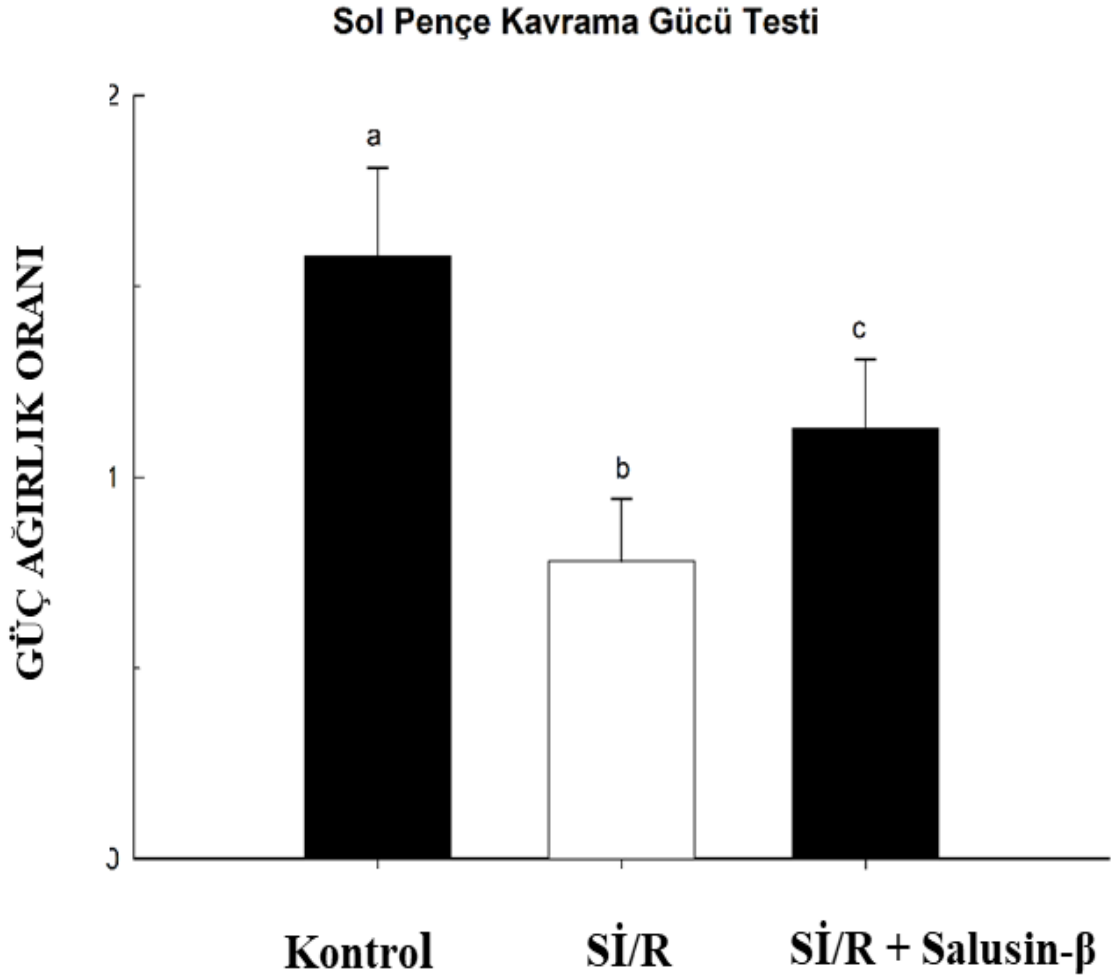


Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermekte, aynı harfler istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmektedir; ^{a,b} $p<0.05$

Şekil 4.2. Salusin- β 'nın yapışkan çıkarma süresi üzerine etkisi

4.1.4 Salusin- β 'nın Kavrama Gücü (Grip Strenght) Testi Üzerine Etkisi

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nın kavrama gücü (grip strenght) testi üzerine etkisi Şekil 4.4'te verildi. Bu test ile hesaplanan sol pençe kavrama gücü ağırlık oranı Sİ/R grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve Salusin- β uygulanan grupta bu oranın Sİ/R grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0.05$).

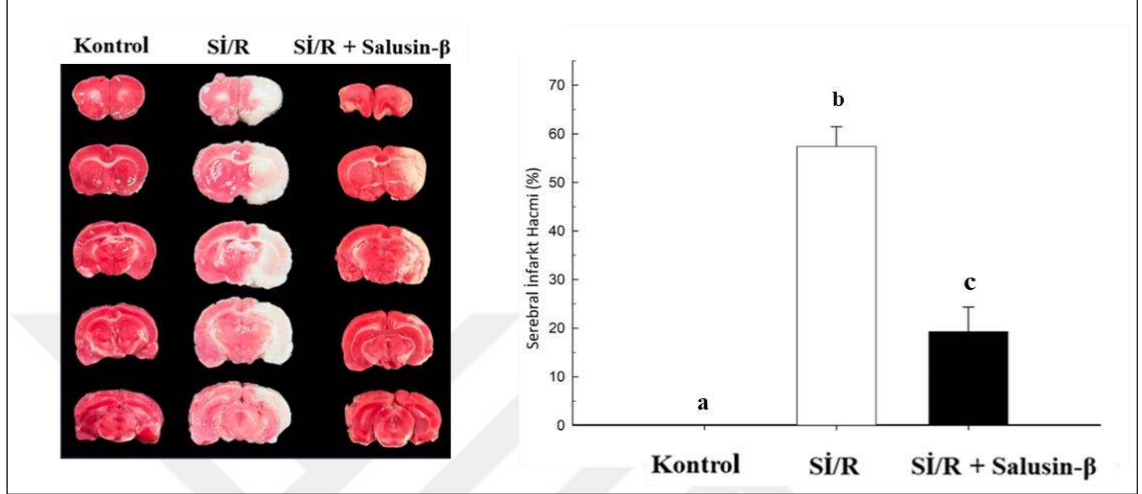


(Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b, c birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermekte, aynı harfler istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmektedir; ^{a,b,c} $p<0.05$).

Şekil 4.3. Salusin- β 'nın kavrama gücü (grip strenght) testi ile hesaplanan sol pençe/sağ pençe kavrama gücü oranı üzerine etkisi

4.2. Salusin- β 'nin İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nin infarkt alan üzerine etkisi Şekil 4.5'te verildi. Sİ/R grubunda meydana gelen infarkt alanının, Salusin- β uygulanması ile azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).



Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a, b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermekte, aynı harfler istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmektedir; $a,bp<0.05$

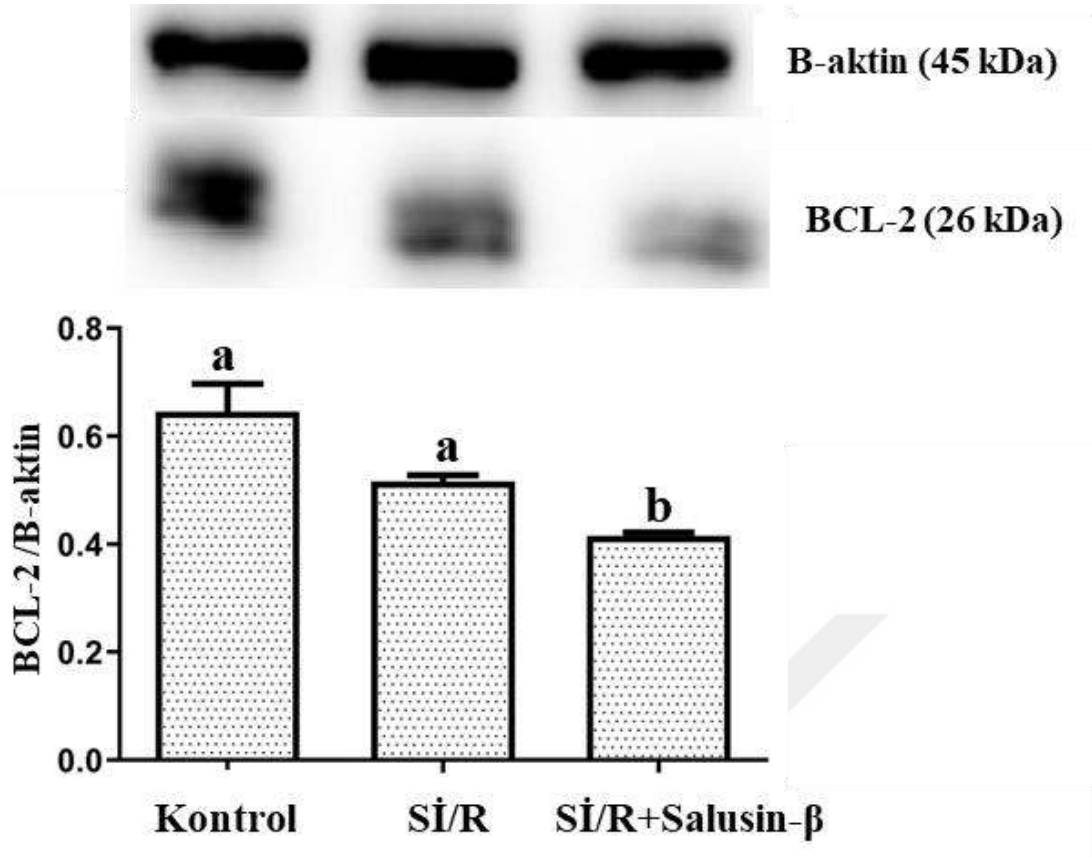
Şekil 4.4. Salusin- β 'nin infarkt alan üzerine etkisi

4.3. Salusin- β 'nin Apoptotik ve Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

4.3.1. Salusin- β 'nin Apoptotik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

A. Salusin- β 'nin BCL-2 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nin beyin dokusundaki BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.6'da verildi. Sİ/R grubunda bu seviye kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşüktü. Salusin- β uygulanan grupta ise Sİ/R grubuna göre BCL-2 seviyesinin azaldığı belirlendi ($p<0.05$).



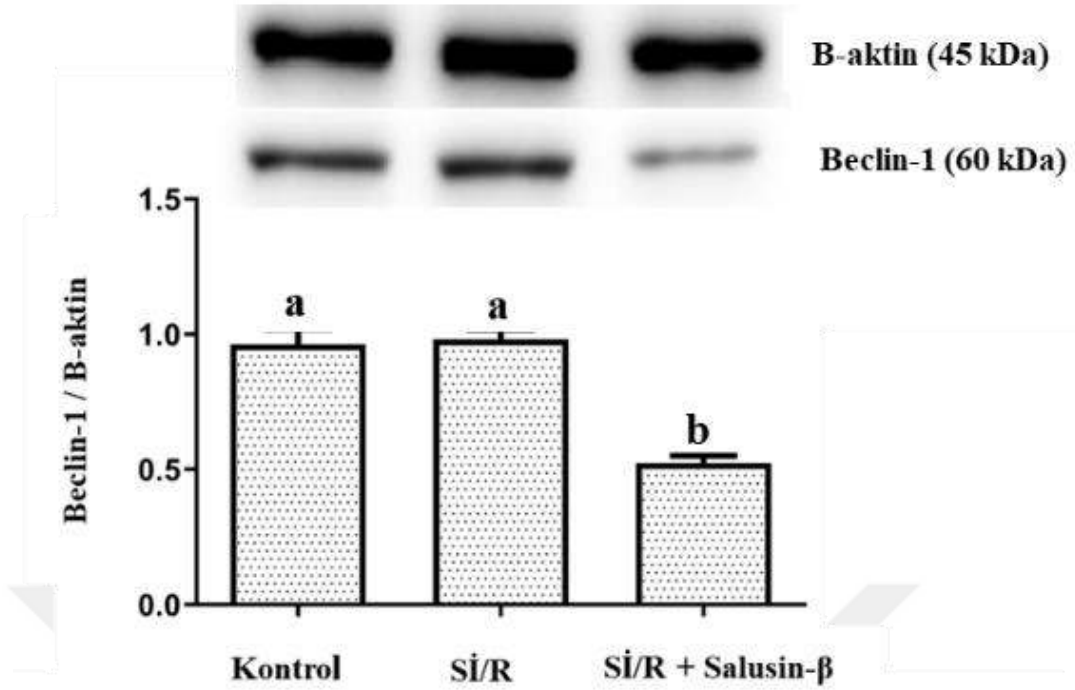
Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel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

Şekil 4.5. Salusin- β 'nın BCL-2 protein seviyesi üzerine etkisi

4.3.2. Salusin- β 'nın Otofajik Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

A. Salusin- β 'nın Beclin-1 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntranazal olarak uygulanan Salusin- β 'nın beyin dokusundaki Beclin-1 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.7'de verildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Sİ/R grubunda bu seviye kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olduğu Salusin- β uygulanan grupta ise Sİ/R grubuna göre Beclin-1 seviyesinin azaldığı belirlendi (p<0.05).

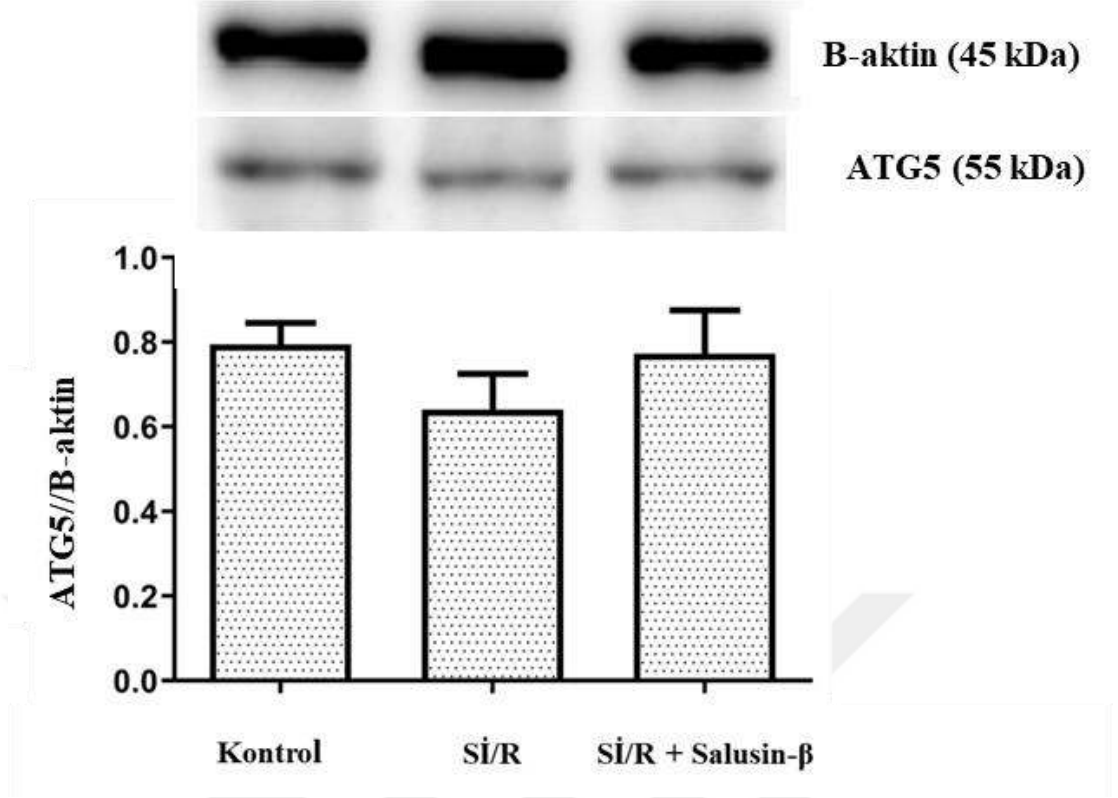


Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel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

Şekil 4.7. Salusin-β'nın Beclin-1 seviyeleri üzerine etkisi

B. Salusin-β'nın ATG5 Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntranazal olarak uygulanan Salusin-β'nın beyin dokusundaki ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.8'da verildi. Yapılan istatistiksel analizler Si/R grubunda ATG5 protein seviyesinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu gösterdi. Salusin-β uygulanan grupta ise Si/R grubuna göre ATG5 seviyesinin arttığı belirlendi. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

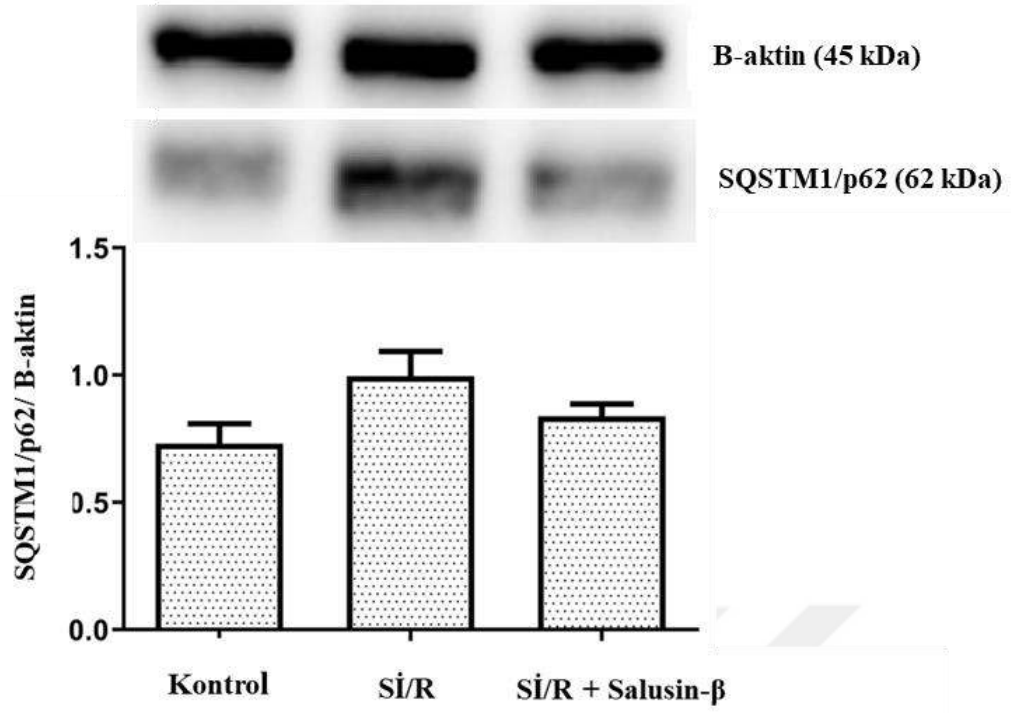


Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

Şekil 4.8. Salusin-β'nın ATG5 protein seviyesi üzerine etkisi

C. Salusin-β'nın p62 Seviyeleri Üzerine Etkileri

İntranazal olarak uygulanan Salusin-β'nın beyin dokusundaki p62 protein seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.9'da verildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Sİ/R grubunda p62 protein seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu, Salusin-β uygulanan grupta ise Sİ/R grubuna göre bu seviyenin düştüğü belirlendi. Fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Verilerin değeriendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değeriendirildi. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.

Şekil 4.9. Salusin-β'nın p62 protein seviyesi üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Sİ beyne giden damarların tıkanması sonucu serebral kanlanmanın azalması ve/veya kesintiye uğramasıyla meydana gelen yoğun nöronal hasar ile karakterize patofizyolojik süreçtir. NDS, Sİ/R oluşumu sonrası meydana gelen nörolojik bozuklukları inceleyen bir skorlama yöntemidir ve bu yöntemde çoğunlukla Baderson skorlama metodu kullanılmakta böylece hayvandaki Sİ/R hasarına bağlı olarak gelişen nörolojik bozukluklar tespit edilebilmektedir (96). İnfarkt alan hesaplaması TTC boyama metoduyla dokudaki canlı ve cansız bölgelerin ayrımı ile cansız doku alanının tespiti esasına dayanıp Sİ/R'nin neden olduğu hasarın büyüklüğünü göstermektedir (97). Davranış testlerinden rotarod Sİ/R nedenli denge-motor koordinasyon kaybının değerlendirilmesini sağlar (98). Yapışkan çıkarma testi somatosensoriyel kaybın belirlenmesini sağlar (99). Kavrama gücü testleri ise ön pençelerde kavrama gücü kaybının değerlendirilmesini sağlamaktadır (100).

Salusin- β 'nin vücuttaki hem nöronal proliferasyonu, nörojenezi artırıcı ve nöroinflamasyonu azaltıcı hem de Sİ/R nedenleri arasında yer alan metabolik parametreleri iyileştirici rolleri Sİ/R hasarını hafifletebileceğini akla getirmektedir (20). Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş farelerde intranazal Salusin- β uygulanan gruptaki farelerin telde asılı kalma sürelerinin Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş gruptaki farelere göre arttığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar Salusin- β 'nin Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş farelerde motor fonksiyonlarını iyileştirdiği şeklinde yorumlanmıştır (20). Yaptığımız çalışmada Salusin- β 'nin rotarod test süresini uzattığı, yapışkan çıkarma süresini kısalttığı ve güç testi sonuçlarını iyileştirdiğini belirledik. Buradan yola çıkarak motor fonksiyonlarını iyileştirdiği yorumu yapılabilir.

Apoptoz, hücre çekirdeğinde büzüşme ve kromatin yoğunlaşması ile başlayan ve bunu sitoplazmada vakuol oluşumu ile yoğunlaşmanın takip ettiği programlı hücresel ölüm sürecidir (101). Bu süreçte rol alan sırasıyla anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerden olan BCL-2 ve BAX proteinleri öne çıkmaktadır (102, 103). Sİ/R sürecinde BCL-2 protein seviyesi düşerken BAX protein seviyesinde artış görülür. Bu durum Sİ/R sürecinde apoptotik aktivitenin artışına ve buna bağlı nöronal hasara neden olur (104). Çalışmamızda, Salusin- β uygulanan grupta anti-apoptotik BCL-2 proteini seviyesi Sİ/R grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Salusin- β uygulamasının anti-apoptotik

proteinlerden olan BCL-2 protein seviyesini düşürerek apoptozu indüklediği sonucu elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışma Salusin- β 'nin yüksek glikoz ile indüklenen insan retinal kılcal endotel hücrelerinde Kaspaz-3 ve BAX'ın ekspresyonlarında belirgin şekilde artış, BCL-2 ekspresyonunda ise azalma gözlenmiş bunlar göz önüne alınınca Salusin- β 'nin inflamasyonu ve apoptozu şiddetlendirdiğini düşünmüşlerdir (105).

Yapılan bir çalışmada sisplatin ve lipopolisakkarit ile indüklenen böbrek hasarında Salusin- β 'nin rolü araştırılmış ve Salusin- β ekspresyonunun, renal tübüler hücrelerde sisplatin ve lipopolisakkarit tarafından indüklenen böbrek dokularında yukarı regüle edildiği bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, sisplatin kaynaklı renal tübüler hücre apoptozu üzerinde Salusin- β 'nin yıkım veya aşırı ekspresyonunun etkileri incelenmiş, kaspaz-3 aktivitesinde sisplatinin neden olduğu artışlar Salusin- β geninin nakavt edilmesi ile büyük ölçüde azaltılmıştır. Bu bulgular, apoptozla ilişkili proteinlerin ölçümü ile daha da desteklenmiştir. Sisplatin hasarı, BAX, kaspaz-3 ve PARP dahil olmak üzere hücre apoptozu ile ilgili proteinlerin ekspresyonlarını önemli ölçüde artırmış. Bununla birlikte (106), anti-apoptoz ile ilişkili protein Bcl-2 seviyelerini düşürmüştür, Salusin- β 'nin gen silinmesi ile bu durum tersine çevrilmiştir (107). İnsan göbek kordonu endotel hücrelerine yüksek glukoz uygulanan bir çalışmada apoptotik proteinlerden olan kaspaz-3 ve BAX protein seviyesinin arttığı BCL-2 protein seviyesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Salusin- β 'nin baskılanmasıyla kaspaz-3 ve BAX protein seviyesinin azaldığı BCL-2 protein seviyesinin ise arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında Salusin- β baskılanmasının yüksek glikoz kaynaklı apoptozu azalttığı bildirilmiştir (108). Bizim çalışmamızda ise Sİ kaynaklı azalan BCL-2 seviyesinin Salusin- β uygulaması ile daha da azaldığını tespit ettik. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Salusin- β 'nin inflamasyonu ve apoptozu şiddetlendirdiği yönündedir.

Otofaji (otofagositoz), hücreleri gereksiz stres ve uyumsuz hücre sinyallerinden muhafaza eden hücre düzeyindeki savunma mekanizmalarından biridir (66). Otofajinin temel tetikleyicileri, Sİ/R patofizyolojisinde yer alan hücredeki hipoksik ortam, azalmış ATP düzeyleri ve mitokondriyal hasardır (109). Buna karşın hücrede otofajik süreç ile enerji üretiminin sağlanması ve hücrel hasarın en aza indirilmesi amaçlanır (110). Otofaji, Sİ/R hasarının ilerlemesinde oldukça önemlidir. Hasarlı proteinleri ortadan kaldırmak ve Sİ'nin ilk aşamasında hücrenin hayatta kalmasını desteklemek için bir onarım mekanizması görevi gördüğü ancak aşırı otofajinin de apoptozu destekleyerek

hücrenin hayatta kalmasını engellediği ve böylece Sİ/R hasarını ağırlaştırdığı bildirilmiştir (106). Dolayısıyla otofajinin Sİ/R patofizyolojisiyle tetiklenerek nöronal hasarı şiddetlendirici mi yoksa enerji üretiminin sağlanması yoluyla nöronal hasara karşı koruyucu mu olduğu henüz tam aydınlatılmamıştır (111). Genel kanı otofajinin faydalı olabileceği yönünde olsa da otofajinin hangi düzeyde aktif olmasının yararlı veya zararlı olacağı hususunda henüz literatüre tatmin edici düzeyde kanıtlar sunulamamıştır.

Otofajide en kıymetli adım otofagozom olarak isimlendirilen keseciğin oluşması daha sonra bu keseciğe hedef organel ve proteinlerin seçilerek alınmasıdır (112). Bu mekanizmada otuzdan fazla protein görev alır ve bunlar “Otofaji-İlişkili Gen (ATG)” olarak tanımlanmaktadır (113). Otofagozomun oluşumunda, uzamasında, otofagozoma hedef organel/proteinlerin seçici bir şekilde alınmasında ve otofagozomun kapanmasında Beclin-1, ATG5, ATG7 ve p62 proteinleri anahtar rol oynayan proteinlerdir (114, 115). Beclin-1, otofaji sürecinde otofagozom oluşumunun başlamasında rol oynayan en önemli bir proteindir (116). Beclin-1 otofagozomal membranın oluşumunda gerekli olduğu için otofaji aktivasyonunun belirlenmesinde biyo belirteç olarak kullanılmaktadır (117). ATG5 ve ATG7 proteinleri ise otofajiyi indükleyen esansiyel proteinlerdir. ATG5 ve ATG7 proteinleri otofagozomal membranın uzamasında ve kapanmasında kritik/esansiyel rol oynamaktadırlar (118). Yapılan bir çalışmada otofaji göstergesi olan ATG5 proteininden yoksun farelerde nörodejeneratif hasar geliştiği ve bu durumun otofaji baskılanması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (119). Yapılan bir diğer çalışmada ATG7 yoksunu farelerde otofaji kaybına bağlı olarak nörodejenerasyonun meydana geldiği gösterilmiştir (120). Bu çalışmalar otofajik aktivitenin baskılanmasının nöronal hasarı artırdığını düşündürmektedir.

Guo H, ve ark. tarafından sağ orta serebral arterin oklüzyonu ile oluşturulan farelerde uzaktan ekstremitte iskemik ardkoşullama yapılarak iskemik hasarın azaltılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tedavi grubunda Beclin-1 ile ATG5 protein seviyelerinin arttığı ve p62 protein seviyeleri ile infarkt alanının azaldığı görülmüştür (121). Bu çalışma otofajik aktivitedeki artışın Sİ/R'nin neden olduğu nöronal hasarı hafifletebileceğini düşündürmektedir. Salusin-β'nın Sİ/R hasarı üzerine tedavi edici etkinliğini incelediğimiz çalışmamızda ATG5 protein seviyesinin Sİ/R oluşturulan gruba kıyasla arttığı, p62 seviyesinin ise azaldığını bulduk ve bu verilerimizin Salusin-β'nın otofajik aktiviteyi artırarak Sİ/R hasarını azaltabileceği yönündedir.

Yapılan bir çalışmada ise otofaji sürecinin başlangıç aşamasındaki önemli bir düzenleyici molekül olan Beclin-1, Sİ'nin hipoperfüzyon hasarıyla önemli ölçüde arttığı daha sonra uygulanan Breviscapine ile seviyesinin aşağı regüle olduğu ve Breviscapine'nin sıçan felç modelinde Beclin-1 seviyesini düşürerek nöroprotektif bir etki ortaya koyduğu gösterilmiştir (122). Bir diğer çalışmada ise Beclin-1' azalmasının otofaji aktivasyonunu inhibe ettiği ve fokal serebral enfarktüstten sonra ipsilateral talamusa ikincil nörodejeneratif hasarı önlediği bildirilmiştir (123). Yapılan başka bir çalışmada da Sİ sonrası Katalpol uygulaması Beclin-1 ekspresyonunu aşağı regüle ederek Sİ sonrası nöronal yaralanmayı ve aşırı otofajiyi hafiflettiği bulunmuştur (124). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, Sİ sonrası uygulanan Salusin-β'nın Beclin-1 seviyesini anlamlı şekilde azalttığı ve böylece aşırı otofajik aktivitenin önlenmesine sebep olarak Sİ/R hasarında Salusin-β'nın iyileştirici etkileri olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürde Salusin-β'nın İ/R üzerine etkilerinin incelenip değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada kardiyak hipertrofisi olan sıçanların kalp dokusunda artmış ATG5 düzeylerinin Salusin-β'nın aşağı regülasyonundan sonra baskılandığı gösterilmiştir (125). Salusin-β'nın baskılanması kardiyak hipertrofisi olan sıçanların kalbindeki LC3 ve Beclin1 düzeylerinin artışı da engellemiş ve bu sonuçlarla Salusin-β'nın aşağı regülasyonunun, otofaji yoluyla kardiyak hipertrofisini hafifletebileceği ortaya konulmuştur (125). Başka bir çalışmada ise otofajinin uyarılmasının nöroprotektif etkinlik göstererek spinal kord hasarını azaltabileceği bildirilmiştir (126). Çalışmamızda, Sİ sonrası Salusin-β uygulamasıyla ATG5 protein seviyesinin artırdığı, p62 protein seviyesini ise azaldığını belirledik ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük. Buna karşın Beclin-1 protein seviyesinin ise anlamlı olarak azaldığını belirledik. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber ATG5 protein seviyesindeki artış ve p62 protein seviyesindeki azalmayı otofajik aktivitenin düşük düzeyde uyarıldığı şeklinde yorumladık. Bununla birlikte Beclin-1 seviyesindeki anlamlı azalma Salusin-β'nın otofajik aktiviteyi baskılandığı anlamına gelmektedir. Aşırı otofajinin apoptozu desteklediği ve hücrenin hayatta kalmasını engellediği böylece Sİ/R hasarını ağırlaştırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (106). Bu bakımdan Salusin-β'nın, Beclin-1 seviyesini azaltmasının aşırı otofajik aktiviteyi engellenmiş olabileceği ve böylece Sİ/R hasarını hafifletici bir etki ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz

Mevcut literatür verileriyle birlikte çalışma sonuçlarımız incelendiğinde Sİ/R sonrasında Salusin- β uygulaması ile NDS skorunda azalma, infarkt alanda azalma ve davranış testleri üzerinde iyileşmeye neden oldu bu etkinin otofajik belirteçlerdeki artışın apoptotik belirteçlerdeki artışın önüne geçerek Sİ sonrası Salusin- β uygulamasının Sİ hasarına karşı iyileştirici etkilerinin olabileceği göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, deneysel Sİ/R modeli oluşturulan sıçanlarda Salusin- β 'nın intranazal olarak uygulanmasının etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmamızın sonuçlarına göre Salusin- β uygulaması, Sİ/R nedeniyle nörolojik defisit skorlarında meydana gelen artışı, etiket çıkarma testindeki uzamış süreyi ve infarkt alanın anlamlı olarak azalmasına sebep oldu. Aynı zamanda rotarod ve kavrama gücü testlerinde Sİ/R'ye bağlı olarak meydana gelen azalmaları da anlamlı düzeyde iyileştirdi. Bu veriler ışığında Salusin- β uygulamasının Sİ/R hasrının oluşturduğu nöro-motor-koordinasyon fonksiyonlarda toplam bir iyileşmeye neden olduğu söylenebilir.

Salusin- β uygulanmasının etkilerinin apoptoz ve/veya otofaji aracılı mı olarak oluştuğunun gösterilmesi için de BCL2, Beclin-1, ATG5 ve p62 seviyelerini Western Blot yöntemiyle belirledik. Sİ/R sonrasında anti-apoptotik BCL2 protein seviyesinde meydana gelen bir azalmanın, Salusin- β uygulanmasıyla anlamlı bir azalma şekline geldiğini gözlemledik. Bu sonucu, Salusin- β uygulamasının apoptozun şiddetlendirdiği şeklinde yorumladık.

Otofajik genlerden Beclin-1 ve P62 protein seviyelerinin Salusin- β uygulanmasıyla azaldığını ancak bu azalmaların sadece Beclin-1 için anlamlı olduğunu gözlemledik. Salusin- β uygulanması, ATG5 protein seviyelerinde ise artış meydana getirdi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Beclin-1 protein seviyelerindeki anlamlı azalmanın aşırı otofajik aktiviteyi baskılayıcı yönde bir etkiyi gösterdiğini söyleyebiliriz. ATG5 ve p62 protein seviyelerinde meydana gelen ancak anlamlı olmayan değişimler ise kısmen otofajik bir aktivitenin başladığı şeklinde yorum yapmamıza neden olmuştur. Aşırı otofajik aktivitenin hücrel hasara sebep olduğuna dair literatürde bilgiler bulunmaktadır. Ancak otofajik biyobelirteçlerin (Beclin-1, ATG5 ve p62) seviyelerinde ne düzeyde bir değişiklik (artma/azalma) olduğunda bunun aşırı otofajik aktivite olarak değerlendirileceğine dair literatürde herhangi standart bir ölçek veya değerlendirme yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen veriler bağlamında Beclin-1 protein seviyelerinde meydana gelen ve otofajik aktivitenin anlamlı olarak baskılandığına kanıt sağlayan bu bulgu ile ATG5 ve P62 protein seviyelerinde meydana gelen ve otofajik aktivitenin artışına işaret eden ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişimlerin belki de bir denge oluşturarak aşırı otofajik aktiviteyi dengelediği düşünülebilir. Böylelikle nörolojik defisit skorlamalarında, etiket çıkarma,

rotarod ve kavrama gücü testlerinde Sİ/R kaynaklı meydana gelen kayıpların anlamlı olarak geri kazanılmasına katkı yaptığı söylenebilir. Bununla birlikte, apoptoz yolağının sadece anti-apoptotik BLC2 gibi bir belirteç ile belirlenmeye çalışılması çalışmamız için bir sınırlılık oluşturmaktadır. Bax gibi pro-apoptotik ilave belirteçlerin seviyelerinin belirlenmesi ile yolağın daha iyi anlaşılabilmesine katkı sağlayabilir. Çalışmamız için bir diğer kısıtlılık da histolojik bir parametrenin sunulmamış olmasıdır. İmmunohistokimyasal veya benzeri bir görüntüleme yöntemi ile otofajik ve apoptotik süreçlerle ilgili ilave ve destekleyici kanıtlar elde etmek mümkün olabilirdi. Bu kısıtlılıklar da dikkate alınarak planlanacak yeni çalışmalarla mekanizmaya daha ayrıntılı kanıtlar sağlanabilecektir.



KAYNAKLAR

1. Boyd LA, Hayward KS, Ward NS, Stinear CM, Rosso C, Fisher RJ, ve ark. Biomarkers of stroke recovery: consensus-based core recommendations from the stroke recovery and rehabilitation roundtable. *Int J Stroke*. 2017;12(5):480-93.
2. Ramos E, Patiño P, Reiter RJ, Gil-Martín E, Marco-Contelles J, Parada E, ve ark. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med*. 2017;104:32-53.
3. Li J, Yuan M, Liu Y, Zhao Y, Wang J, Guo W. Incidence of constipation in stroke patients: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(25):e7225.
4. Cimarosti H, Henley JM. Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *Neuroscientist*. 2008;14(6):626-36.
5. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17(10):1048-56.
6. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994;25(8):1658-64.
7. Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungreis CA, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke*. 1999;30(1):93-9.
8. Astrup J, Symon L, Branston N, Lassen N. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 1977;8(1):51-7.
9. Yu S, Wu K, Liang Y, Zhang H, Guo C, Yang B. Therapeutic targets and molecular mechanism of calycosin for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(12):16804.
10. Chen L, Zhang G, Khan AA, Guo X, Gu Y. Clinical efficacy and meta-analysis of stem cell therapies for patients with brain ischemia. *Stem Cells Int*. 2016;2016(1):6129579.
11. Chen B, Liao WQ, Xu N, Xu H, Wen JY, Yu CA, ve ark. Adiponectin protects against cerebral ischemia–reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res Brain Res Rev*. 2009;1273:129-37.
12. Liu L, Chen H, Jin J, Tang Z, Yin P, Zhong D, ve ark. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation. *Life Sci*. 2019;239:117036.

13. Fujimoto K, Hayashi A, Kamata Y, Ogawa A, Watanabe T, Ichikawa R, ve ark. Circulating levels of human salusin- β , a potent hemodynamic and atherogenesis regulator. *PLoS One*. 2013;8(10):e76714.
14. Yildirim A, Kucukosmanoglu M. Relationship between serum salusin beta levels and coronary artery ectasia. *Acta Cardiol Sin*. 2021;37(2):130.
15. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y. Salusins: newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. *Nat Med*. 2003;9(9):1166-72.
16. Nowaczyk J, Blicharz L, Zawistowski M, Sikora M, Zaremba M, Czuwara J, ve ark. The Clinical Significance of Salusins in Systemic Sclerosis—A Cross-Sectional Study. *Diagnostics*. 2023;13(5):848.
17. Citil C, Konar V, Aydin S, Yilmaz M, Albayrak S, Ozercan IH, ve ark. Brain, liver, and serum salusin-alpha and-beta alterations in Sprague-Dawley rats with or without metabolic syndrome. *Med Sci Monit*. 2014;20:1326.
18. Tanyeli A, Eraslan E, Polat E, Bal T. Protective effect of salusin- α and salusin- β against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2017;28(6):623-30.
19. Watanabe T, Nishio K, Kanome T, Matsuyama T, Koba S, Sakai T, ve ark. Impact of salusin- α and- β on human macrophage foam cell formation and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2008;117(5):638-48.
20. Chang Y, Yoo J, Kim H, Park HJ, Jeon S, Kim J. Salusin- β mediate neuroprotective effects for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1428-33.
21. Çakır M, Sabah-Özcan S, Saçmacı H. Increased level of plasma salusin- α and salusin- β in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;30:76-80.
22. Cakir M, Duzova H, Taslidere A, Orhan G, Ozyalin F. Protective effects of salusin- α and salusin- β on renal ischemia/reperfusion damage and their levels in ischemic acute renal failure. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2017;92(2):122-33.
23. Wang Y, Wang S, Zhang J, Zhang M, Zhang H, Gong G, ve ark. Salusin- β is superior to salusin- α as a marker for evaluating coronary atherosclerosis. *J Int Med Res*. 2020;48(2):0300060520903868.

24. Smith KJ, Ainslie PN. Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Exp Physiol*. 2017;102(11):1356-71.
25. Şahan M, Satar S, Koç AF, Sebe A. İskemik inme ve akut faz reaktanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010;19(2):85-140.
26. Tunalı G. Beynin Enerji Metabolizması Derleme. *Clin Exp Immunol*. 2009;2(1).
27. Rink C, Khanna S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(10):1889-903.
28. Tan A, Roberts D. Cerebral circulation 1: anatomy. *BJA Educ*. 2021;21(10):390-5.
29. Karataş A. Circulus arteriosus cerebri (Willis poligonu) anatomisi; kranial bilgisayarlı tomografi anjiyografi ile klinik olarak değerlendirilmesi [doktora tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2012.
30. Karatas A, Coban G, Cinar C, Oran I, Uz A. Assessment of the circle of Willis with cranial tomography angiography. *Med Sci Monit*. 2015;21:2647.
31. Valentinuzzi ME, Díaz R. The Brain Willis Circle and Ring Electric Power Systems: Analogies. *IEEE pulse*. 2018;9(1):40-5.
32. Sobotta J. Sobotta Atlas Of Human Anatomy 13th ed: Williams & Wilkins; 2001. 30-5 p.
33. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*. 1995;66(1):149-73.
34. Utku U. İnme Tanımı, Etiyolojisi, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. *Turk J Phys Med Rehabil*. 2007;53.
35. Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, Johnson CO, Alam T, Parmar PG, ve ark. GBD Lifetime Risk of Stroke Collaborators Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*. 2018;379(25):2429-37.
36. Montaña A, Hanley DF, Hemphill III JC. Hemorrhagic stroke. *Handb Clin Neurol*. 2021;176:229-48.
37. Kaya M. Hemorajik inme-iskemik inme ayırıcı tanısında hematolojik parametrelerin ve CRP'nin yeri [uzmanlık tezi]. Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi; 2018.
38. Randolph SA. Ischemic stroke. *Workplace Health Saf*. 2016;64(9):444-.
39. Valery LF, Emma N, Tahiya A, Marlina SB, Ettore B, Natacha B, ve ark. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18:459-80.

40. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, ve ark. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639.
41. O'donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, ve ark. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the interstroke study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112-23.
42. Pu L, Wang L, Zhang R, Zhao T, Jiang Y, Han L. Projected global trends in ischemic stroke incidence, deaths and disability-adjusted life years from 2020 to 2030. *Stroke*. 2023;54(5):1330-9.
43. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, ve ark. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2019;50(12):e344-e418.
44. Robbins NM, Swanson RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. *Stroke*. 2014;45(6):1881-6.
45. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010;468(7321):232-43.
46. Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke*. 2012;7(5):378-85.
47. Bang O, Saver J, Alger J, Starkman S, Ovbiagele B, Liebeskind D. Determinants of the distribution and severity of hypoperfusion in patients with ischemic stroke. *Neurology*. 2008;71(22):1804-11.
48. Xiao C, Robertson RM. Timing of locomotor recovery from anoxia modulated by the white gene in *Drosophila*. *Genetics*. 2016;203(2):787-97.
49. Kim MJ, Hur J, Ham IH, Yang HJ, Kim Y, Park S, ve ark. Expression and activity of the na-k ATPase in ischemic injury of primary cultured astrocytes. *The Korean Journal of Physiology Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society the Korean Society of Pharmacology*. 2013;17(4):275.
50. Brassai A, Suvanjeiev R-G, Bán E-G, Lakatos MJBrb. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. *Brain Res Bull*. 2015;112:1-6.

51. Ding S. Ca²⁺ signaling in astrocytes and its role in ischemic stroke. *Adv Neurobiol.* 2014;189-211.
52. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014;115:157-88.
53. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010;47(2):122-9.
54. Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005;28(12):670-6.
55. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1415-30.
56. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41(1):367-401.
57. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):173-87.
58. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-88.
59. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003;17(20):2481-95.
60. Hickey EJ, You X, Kaimaktchiev V, Stenzel-Poore M, Ungerleider RM. Lipopolysaccharide preconditioning induces robust protection against brain injury resulting from deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(6):1588-96.
61. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
62. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
63. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94(4):491-501.
64. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005;121(5):671-4.
65. Özkaya S. Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Agomelatinin Etkilerinin Araştırılması [yüksek lisans tezi]. Malatya:İnönü Üniversitesi; 2024.
66. Das G, Shrivastava BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(6):a008813.

67. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
68. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004;23(16):2891-906.
69. Li H, Wu J, Shen H, Yao X, Liu C, Pianta S, ve ark. Autophagy in hemorrhagic stroke: mechanisms and clinical implications. *Prog Neurobiol*. 2018;163:79-97.
70. Sun Y, Zhu Y, Zhong X, Chen X, Wang J, Ying G. Crosstalk between autophagy and cerebral ischemia. *Front Neurosci*. 2019;12:1022.
71. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
72. Ruck A, Attonito J, Garces KT, Núñez L, Palmisano NJ, Rubel Z, ve ark. The Atg6/Vps30/Becn1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*. 2011;7(4):386-400.
73. Wang W, Fan H, Zhou Y, Duan P, Zhao G, Wu G. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line. *Mol Med Rep*. 2013;7(5):1501-5.
74. Evangelisti C, Evangelisti C, Chiarini F, Lonetti A, Buontempo F, Neri LM, ve ark. Autophagy in acute leukemias: a double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2015;1853(1):14-26.
75. Ülgenalp O, KOÇ BT, Oğuzoğlu TÇ. Viral enfeksiyonlarda otofaji. *Türk Hij Deney Biyol Derg*. 2018;75(3).
76. Ozgen M, Koca SS, Dagli N, Balin M, Ustundag B, Isik A. Serum salusin-alpha level in rheumatoid arthritis. *Regul Pept*. 2011;167(1):125-8.
77. Özkan ÖP, Büyükcünal SK, Yiğit Z, İnci Y, Şakar FŞ, Ersü DÖ. Kardiyovasküler hastalık tanısı almış hastaların sağlıklı yaşam biçimi davranışlarının değerlendirilmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2019;12(1):22-31.
78. Sato K, Koyama T, Tateno T, Hirata Y, Shichiri M. Presence of immunoreactive salusin-alpha in human serum and urine. *Peptides*. 2006;27(11):2561-6.
79. Aydın S, Eren MN, Aydın S. Kardiyovasküler Sistemde Salusin- α ve Salusin- β 'nın Fizyolojisi ve Klinik Rolü. *Cardiovascular Sciences*. 2014;26(1):33-8.
80. Izumiyama H, Tanaka H, Egi K, Sunamori M, Hirata Y, Shichiri M. Synthetic salusins as cardiac depressors in rat. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2005;45(3):419-25.

81. T Roe A, Frisk M, E Louch W. Targeting cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis in heart failure. *Curr Pharm Des.* 2015;21(4):431-48.
82. Yu F, Zhao J, Yang J, Gen B, Wang S, Feng X, ve ark. Salusins promote cardiomyocyte growth but does not affect cardiac function in rats. *Regul Pept.* 2004;122(3):191-7.
83. Xiao-Hong Y, Li L, Yan-Xia P, Hong L, Wei-Fang R, Yan L, ve ark. Salusins protect neonatal rat cardiomyocytes from serum deprivation-induced cell death through upregulation of GRP78. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2006;48(2):41-6.
84. Erden I, Demir B, Uçak H, Cicek D, Dertlioğlu SB, Aydın S. Serum salusin- α and salusin- β levels in patients with Behcet's disease. *Eur J Dermatol.* 2014;24:577-82.
85. Sato K, Sato T, Susumu T, Koyama T, Shichiri M. Presence of immunoreactive salusin- β in human plasma and urine. *Regul Pept.* 2009;158(1-3):63-7.
86. Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Atsumi T, Kim-Kaneyama J, ve ark. Salusin- β accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling in LDL receptor-deficient mice in vivo and HUVECs in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(1):H96-H105.
87. Zhao MX, Zhou B, Ling L, Xiong XQ, Zhang F, Chen Q, ve ark. Salusin- β contributes to oxidative stress and inflammation in diabetic cardiomyopathy. *Cell Death Dis.* 2017;8(3):e2690-e.
88. Sun HJ, Zhao MX, Liu TY, Ren XS, Chen Q, Li YH, ve ark. Salusin- β induces foam cell formation and monocyte adhesion in human vascular smooth muscle cells via miR155/NOX2/NF κ B pathway. *Sci Rep.* 2016;6(1):23596.
89. Zhou CH, Liu LL, Wu YQ, Song Z, Xing SH. Enhanced expression of salusin- β contributes to progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(4):463-71.
90. Chen H, Mohuczy D, Li D, Kimura B, Phillips M, Mehta P, ve ark. Protection against ischemia/reperfusion injury and myocardial dysfunction by antisense-oligodeoxynucleotide directed at angiotensin-converting enzyme mRNA. *Gene Ther.* 2001;8(10):804-10.
91. Kimura M, Kosuge K, Ko Y, Kurosaki N, Tagawa N, Kato I, ve ark. Potent Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Designed from Salusin- β and HIV-1 Tat(49-57). *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 2020;68(8):810-3.

92. Wang J, Wang Y, Shan S, Hu T, Chen H, Tian J, ve ark. Salusins protect myocardium against ischemic injury by alleviating endoplasmic reticulum stress. *Sci China Life Sci.* 2012;55:358-66.
93. Zhang Q, Chen WM, Zhang XX, Zhang HX, Wang HC, Zheng FY, ve ark. Overexpression of salusin- β is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Oncology reports.* 2017;37(3):1826-32.
94. Suzuki N, Shichiri M, Tateno T, Sato K, Hirata Y. Distinct systemic distribution of salusin- α and salusin- β in the rat. *Peptides.* 2011;32(4):805-10.
95. Sato K, Koyama T, Tateno T, Hirata Y, Shichiri M. Presence of immunoreactive salusin- α in human serum and urine. *Peptides.* 2006;27(11):2561-6.
96. Desland FA, Afzal A, Warraich Z, Mocco J. Manual versus automated rodent behavioral assessment: comparing efficacy and ease of Bederson and Garcia neurological deficit scores to an open field video-tracking system. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2014;6:S13194.
97. Yang Y, Shuaib A, Li Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J Neurosci Methods.* 1998;84(1-2):9-16.
98. Brooks SP, Trueman RC, Dunnett SB. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2012;2(1):37-53.
99. Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, ve ark. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc.* 2009;4(10):1560-4.
100. Li XJ, Liang L, Shi HX, Sun XP, Wang J, Zhang LS. Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017:1733-40.
101. Savran M, Aslankoç R, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Temel EN, ve ark. Agomelatine could prevent brain and cerebellum injury against LPS-induced neuroinflammation in rats. *Cytokine.* 2020;127:154957.
102. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(1):26-34.

103. Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu S, Xu M, Hsu Y. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation. *Apoptosis*. 2003;8:617-29.
104. Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomed Rep*. 2013;1(6):861-7.
105. Wang H, Zhang M, Zhou H, Cao L, Zhou J, Chen Q, et al. Salusin- β mediates high glucose-induced inflammation and apoptosis in retinal capillary endothelial cells via a ROS-dependent pathway in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;2291-308.
106. Sun B, Ou H, Ren F, Guan Y, Huan Y, Cai H. Propofol protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating long noncoding RNA SNHG14. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(16):3002-14.
107. Lu QB, Du Q, Wang HP, Tang ZH, Wang YB, Sun HJ. Salusin- β mediates tubular cell apoptosis in acute kidney injury: involvement of the PKC/ROS signaling pathway. *Redox Biol*. 2020;30:101411.
108. Zhu X, Zhou Y, Cai W, Sun H, Qiu L. Salusin- β mediates high glucose-induced endothelial injury via disruption of AMPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(2):515-21.
109. Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, Yokoyama Y, Hayashi Y, Hirayama D, et al. Autophagy and autophagy-related diseases: a review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):8974.
110. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):814-22.
111. Hou K, Xu D, Li F, Chen S, Li Y. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: Mechanisms, roles and research methods. *J Neurol Sci*. 2019;400:72-82.
112. Bahrami AH, Lin MG, Ren X, Hurley JH, Hummer G. Scaffolding the cup-shaped double membrane in autophagy. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(10):e1005817.
113. Lassen KG, Xavier RJ. Genetic control of autophagy underlies pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2017;10(3):589-97.
114. Lin X, Han L, Weng J, Wang K, Chen T. Rapamycin inhibits proliferation and induces autophagy in human neuroblastoma cells. *Biosci Rep*. 2018;38(6):20181822.

115. Liu L, Liao JZ, He XX, Li PY. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget*. 2017;8(34):57707.
116. Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis*. 2008;29(1):132-41.
117. Wu Z, Zou Z, Zou R, Zhou X, Cui S. Electroacupuncture pretreatment induces tolerance against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibition of the autophagy pathway. *Mol Med Rep*. 2015;11(6):4438-46.
118. Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(6):378-85.
119. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuk-Migishima R, ve ark. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-9.
120. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, ve ark. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-4.
121. Guo H, Zhao L, Wang B, Li X, Bai H, Liu H, ve ark. Remote limb ischemic postconditioning protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating AMPK-dependent autophagy. *Brain Res Bull*. 2018;139:105-13.
122. Cun Y, Guo C, Jin Y, Zhou L, Zhang C, Chen N, ve ark. Breviscapine ameliorates autophagy by activating the JAK2/STAT5/BCL2 pathway in a transient cerebral ischemia rat model. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2024;83(7):615-25.
123. Xing S, Zhang Y, Li J, Zhang J, Li Y, Dang C, ve ark. Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction. *Autophagy*. 2012;8(1):63-76.
124. Liu K, Yao X, Gao J, Wang J, Qi J. A study on the mechanism of Beclin-1 m6A modification mediated by catalpol in protection against neuronal injury and autophagy following cerebral ischemia. *Molecular Medicine*. 2024;30(1):65.
125. Dang JY, Zhang W, Chu Y, Chen JH, Ji ZL, Feng P. Downregulation of salusins alleviates hypertrophic cardiomyopathy via attenuating oxidative stress and autophagy. *Eur J Med Res*. 2024;29(1):109.

126. Tang P, Hou H, Zhang L, Lan X, Mao Z, Liu D, et al. Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats. *Mol Neurobiol*. 2014;49:276-87.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Kararı

