

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

**SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE OLUŞAN
NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE 12/15
LİPOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİ**

Dr. Canan ÇAKIR AKTAŞ

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

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

**SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE OLUŞAN
NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE 12/15
LİPOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİ**

Dr. Canan ÇAKIR AKTAŞ

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ebru BODUR**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya KARATAŞ-KURŞUN**

**ANKARA
2018**

Serebral İskemi Modelinde Oluşan Nöroinflamasyon Üzerinde 12/15**Lipoksijenaz İnhibitörlerinin Etkisi****Canan ÇAKIR AKTAŞ****Danışman: Doç. Dr. Ebru BODUR****İkinci Danışman: Doç. Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN**

Bu tez çalışması 21.02.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:*Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE**TOBB ETÜ Üniversitesi***Üye:***Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL**Gazi Üniversitesi***Üye:***Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ-ÖZKAN**Hacettepe Üniversitesi***Üye:***Prof. Dr. Özden TACAL**Hacettepe Üniversitesi***Danışman:***Doç. Dr. Ebru BODUR**Hacettepe Üniversitesi*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

20 Mart 2018

*Prof. Dr. Diclehan ORHAN**Enstitü Müdürü*



“Bu tezi öğrenim yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sevgili Ailem’e ve Sevgili Eşim’e ithaf ediyorum”

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

X Tezimin/Raporumun 21.03.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi



20/03/2018

(İmza)

Dr. Canan ÇAKIR AKTAŞ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Ebru BODUR ve Doç. Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*(İmza)**Dr. Canan ÇAKIR AKTAŞ*

TEŞEKKÜR

İyi bir bilim insanı olma amacıyla çıktığım bu zorlu yolculukta bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, eğitimim süresince beni cesaretlendiren ve desteğini esirgemeyen, değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Ebru Bodur'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım. Bilim insanı kimliği, disiplini ve çalışkanlığı ile örnek aldığım, doktora eğitimimin ilk gününden son anına kadar desteğini hep yanımda hissettiğim eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hülya Karataş-Kurşun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, örnek aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Müge Yemişçi-Özkan'a, Doç. Dr. Emine Eren-Koçak'a teşekkürü borç bilirim. Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili çalışma arkadaşlarım, Dr. Buket Demir'e, Dr. Sinem Yılmaz Özcan'a, Uzm. Dr. Aslıhan Taşkiran'a, Yrd. Doç. Dr. Gül Yalçın Çakmaklı'ya, ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Geleceğin parlak bilim insanı olacaklarına yürekten inandığım laboratuvarımızın vazgeçilmez doktora öğrencileri Zeynep Kaya, Özlem Hökelekli, Burak Uzay, Aslıhan Bahadır Varol, Anisa Deghani, Gökhan Uruk'a ve her sıkıştığımız anda yardımımıza koşan teknisyenimiz Mesut Fırat'a ve tüm Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitü personeline desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Biyokimya Anabilim Dalı bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Z. Günnur Dikmen'e ve tüm anabilim dalı hocalarına desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Hem yüksek lisans hem de doktora tezim sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, Sayın Dr. Esra Büber'e ve her durumda yardımını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Arş.Gör. Müslüm Gök'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığımız, 12/15 LOX inhibitörünü sentezleyen ve bize bağışlayan Sayın Doç Dr. Klaus van Leyen'e teşekkür ederim.

Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Müdürü değerli bilim insanı Sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya desteklerinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Değerli ailem ve sevgili eşime bana verdikleri sonsuz destek ve sabırlarından ötürü en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını destekleyen Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım (Proje No: THD-2016-11381).

ÖZET

Canan, Ç. A. Serebral iskemi modelinde oluşan nöroinflamasyon üzerine 12/15 lipooksijenaz inhibitörlerinin etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Bu tez çalışmasında, 12/15 LOX inhibisyonunun iskemi sonrası gelişen nöroinflamasyon sürecine etkisi incelenmiştir. Bunun için farede kalıcı iskemi ve iskemi/rekanalizasyon (İ/R) olmak üzere iki farklı serebral iskemi modeli oluşturulmuştur. Serebral iskemi ile indüklenen inflamasyon süreci ve 12/15 LOX inhibitörünün bu süreç üzerindeki etkisi 3 farklı zaman noktasında (6, 24 ve 72 saat) incelenmiştir. Bu amaçla kan beyin bariyeri geçirgenliği (MMP-9 ve TIMP-1), mikrogliya aktivasyonu, NLRP1 ve NLRP3 inflamazom protein kompleksleri, pro-inflamatuvar (IL-1beta, IL-6 ve TNF-alfa) ve anti-inflamatuvar sitokinler (TGF-beta ve IL-10) immünohistokimyasal yöntemle incelenmiştir. Ayrıca ELISA ile beyin dokusunda pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin miktarları ölçülmüştür. İskemi sonrası oluşan oksidatif hasarı belirlemek için dokuda malondialdehit miktarları ölçülmüştür. Buna göre inflamasyon süreci iki model arasında zamansal olarak farklılıklar göstermiştir. 12/15 LOX inhibisyonu ile peri-enfarkt alanda inflamatuvar yanıt baskılanmıştır. Serebral iskemi sonrası oksidatif hasar ve inflamatuvar süreçlerin incelenmesinde İ/R modelinin en uygun model olduğu, proinflamatuvar belirteçlerden IL-6, anti-inflamatuvar belirteçlerden TGF-beta'nın belirgin olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, elde edilen tüm bu bulgular 12/15 LOX inhibisyonunun inflamatuvar süreç ile yakından ilişkili olup, inme gibi inflamasyonun tetiklendiği hastalıkların tedavisinde etkin bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İnme, İskemi-rekanalizasyon, 12/15 Lipooksijenaz, Nöroinflamasyon, lipid peroksidasyonu, inflamazom, proinflamatuvar sitokin, anti-inflamatuvar sitokin, MMP-9, TIMP-1.

Destekleyen Kurum: HÜBAP (Proje no: THD-2016-11381)

ABSTRACT

Canan, Ç. A. The Effect of 12/15 lipoxygenase inhibitors on neuroinflammation induced by cerebral ischemia models. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2018. In this study, our aim was to investigate the effect of 12/15 LOX inhibition on neuroinflammation process. For this purpose, two different cerebral ischemia models in mouse, permanent ischemia and ischemia/reperfusion (I/R), have been performed. Cerebral ischemia with two different models-induced inflammation and the effects of 12/15 LOX inhibitor on this process were examined at 3 different time points (6, 24 and 72 hours). Blood brain barrier integrity (MMP-9 ve TIMP-1), microglia activation, NLRP1 and NLRP3 inflammasome protein complexes, pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and anti-inflammatory (TGF- β and IL-10) cytokines, were observed by immunohistochemistry technique. Moreover, amount of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the brain tissues were investigated by ELISA. Tissue levels of malondialdehyde were assessed to analyze oxidative stress following ischemia. In our results, inflammation process induced by ischemia has different properties according to models and time points of the insult and 12/15 LOX inhibition suppressed inflammatory response in the perientart region. I/R model was the most suitable model to examine oxidative damage and inflammatory processes after cerebral ischemia and among proinflammatory markers, IL-6 and among anti-inflammatory markers TGF- β were significantly different in this model. In conclusion, all these findings show that 12/15 LOX inhibition is closely related to the inflammatory process, indicating that it may be an effective target in the treatment of inflammation-induced diseases such as stroke.

Key Words: Stroke, Ischemia-reperfusion, 12/15 Lipoxygenase, Neuroinflammation, lipid peroxidation, inflammasome, proinflammatory cytokine, anti-inflammatory cytokine, MMP-9, TIMP-1

Supported by HÜBAP (Project no: THD-2016-11381)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	v
ETİK BEYAN SAYFASI	vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serebral İskemi ve Nöroinflamasyon	3
2.1.1. İskemik İnmede İnflamatuvar Mediyatörlerin Rolü	5
2.1.2. İskemide İnflamazomların Rolü	7
2.1.3. Serebral İskemide Akut, Subakut ve Kronik Fazlar	8
2.2. Lipoksijenazlar	9
2.2.1. Lipoksijenazların Katalitik Özellikleri	9
2.2.2. Lipoksijenaz Aktivitesinin Düzenlenmesi	11
2.2.3. Lipoksijenazların Fizyolojik ve Patofizyolojik Rolü	12
2.2.4. 12/15 Lipoksijenaz ve Serebral İ/R Sürecine Etkisi	13
2.2.5. Güçlü ve Selektif İnsan 12/15 LOX İnhibitörü: ML351	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri	17
3.2. Yöntemler	18
3.2.1. Orta Serebral Arter Oklüzyonu	19
3.2.2. İskemi/Rekanalizasyon Modelinin Oluşturulması	19
3.2.3. FeCl ₃ İle Kalıcı İskemi Modelinin Oluşturulması	20
3.2.4. Nörolojik Muayene Değerlendirmesi	21

3.2.5. 12/15 LOX İnhibitörünün Uygulanması	21
3.2.6. İmmünohistokimyasal Yöntemle Protein İşaretlemesi	22
3.2.7. Biyokimyasal Analizler İçin Örnek Hazırlanışı	22
3.2.8. Lipit peroksidasyonu /Malondealdehit (MDA) Ölçümü	23
3.2.9. ELISA ile Sitokinlerin Kantitatif Analizi	24
3.2.10. Jetalin Zimografisi	25
4. BULGULAR	27
4.1. Lipid Peroksidasyonunun Malondialdehit Ölçümü ile Belirlenmesi	28
4.2. Serebral İskemi Sonrası Ortaya Çıkan İnflamatuvar Yanıtın Mikroglia Aktivasyonu Üzerinden Değerlendirilmesi	32
4.3. Serebral İskemi Sonrası Ortaya Çıkan İnflamatuvar Yanıtta İnflamazom Protein Komplekslerinin Rolü.	36
4.3.1. NLRP1 İnflamazom Protein Kompleksinin İncelenmesi	37
4.3.2. NLRP3 İnflamazom Protein Kompleksinin İncelenmesi	43
4.4. Serebral İskemi Sonrası İnflamazom Protein Kompleksi İle Aktive Olan IL-1beta'nın İncelenmesi	51
4.5. Serebral İskemi Sonrası Proinflamatuvar IL-6 ve TNF-alfa Sitokin Yanıtının İncelenmesi	64
4.6. Serebral İskemi Sonrası Proinflamatuvar TNF-alfa Sitokin Yanıtının İncelenmesi	78
4.7. Serebral İskemi Sonrası Anti-inflamatuvar TGF-beta ve IL-10 Sitokin Yanıtının İncelenmesi	91
4.8. Serebral İskeminin Artırdığı Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinde MMP-9 ve TIMP-1 Proteinlerinin Farklı İskemi Modelleri ve Farklı Zaman Noktalarında Değerlendirilmesi	117
4.9. Jelatin Zimografisi ile MMP-9 Aktivasyonunun Ölçülmesi	127
5. TARTIŞMA	128
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	135
7. KAYNAKLAR	136
8. EKLER	

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzin Belgesi

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER ve KISALTMALAR

12-HETE	12-Hidroksieikozatetraenoik Asit
15-HETE	15-Hidroksieikozatetraenoik Asit
ALOX	Araşidonat Lipoksijenaz
ASC	CARD içeren Apoptoz ile ilişkili Speck-like protein
ATP	Adenozin Tri Fosfat
CCA	Ana Karotit Arter
COX	Sikloksijenaz
DAMP	Hasarla ilişkili Moleküler Patern
dOSAt	Distal Orta Serebral Arter Tıkanıklığı
ECA	Eksternal Karotit Arter
ELISA	Enzim-Bağlı İmmunosorbent Yöntemi
ER	Endoplazmik Retikulum
HMGB1	High Mobility Grup Kutu 1
İ/R	İskemi/Rekanalizasyon
IHC	İmmünohistokimya
IL-1BETA	İnterlökin 1beta
IL-6	İnterlökin-6
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOX	Lipoksijenaz
MDA	Malondialdehit
MGL1	Makrofaj Galaktoz-Tip Lektin-1
MMP-9	Matriksmetaloprotein-9
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NLRP1	Nod-Like reseptör proteini 1
NLRP3	Nod-Like reseptör proteini 3
NO	Nitrik Oksit
PFA	Paraformaldehit
pOSAt	Proksimal Orta Serebral Arter Tıkanıklığı

PRR	Patern Tanıma Reseptörü
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asiti
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
TIMP-1	Metaloproteinaz Doku İnhibitörü-1
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF-α	Tümör Nekrotizan Faktör-alfa
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
TTC	Trifenil Tetrazolium Klorit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İskemik ve hemorajik inmenin şematik gösterimi.	2
2.2. İnflamasyonun farklı süreçlerinde görevli sitokinler.	5
2.3. İnflamazom kompleksinin bileşenleri.	8
2.4. Lipoksijenazların çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyon mekanizması.	10
2.5. Lipoksijenaz enziminin araşidonik asit yapısında oksijen eklenmesini katalizleyebildiği olası karbon bölgeleri.	11
2.6. Fizyolojik 12/15 LOX aktivitesi inflamasyonun çözünmesinde etkili olurken, enzim aktivitesinin değişmesi kronik inflamasyon sürecinin ilerlemesine yol açar.	13
2.7. ML351 bileşiğinin kimyasal yapısı.	15
2.8. İnflamasyonda 12/15 lipoksijenaz enzimi ve inhibitör bileşiği ML351'in moleküler mekanizması.	16
3.1. İskemi/rekanalizasyon modelinin mikroskop görüntüsü.	20
3.2. Kalıcı iskemi modelinin mikroskop görüntüsü.	21
3.3. İskemi ve iskemi/rekanalizasyon modelleri uygulanan fare beyin kesitlerinde epifloresan veya konfokal lazer taramalı mikroskop ile görüntülenen perienfarkt alan.	22
3.4. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere homojenize edilen beyin bölgesi.	23
4.1. Deney tasarımı ve kullanılan analiz yöntemlerinin şematik gösterimi.	28
4.2. İskemi modelinde 6, 24 ve 72. saatlerde beyin doku homojenizatlarında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen malondialdehit miktarlarının (μM), yaş doku ağırlığına (mg) oranlanarak lipit peroksidasyonunun belirlenmesi.	29
4.3. İskemi/rekanalizasyon modelinde 6, 24 ve 72. saatlerde beyin doku homojenizatlarında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen malondialdehit miktarlarının (μM), yaş doku ağırlığına (mg) oranlanarak lipit peroksidasyonunun belirlenmesi.	30
4.4. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli kontrol (iskemiden 1 saat sonra DMSO verilen) gruplarının lipit peroksidasyonu yönünden karşılaştırılması.	31
4.5. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikrogliyal hücre aktivasyonunun görüntülenmesi.	33

4.6.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikrogial hücre aktivasyonunun görüntülenmesi.	34
4.7.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikrogial hücre aktivasyonunun görüntülenmesi.	36
4.8.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP1 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	38
4.9.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP1 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	40
4.10.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP1 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	42
4.11.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	45
4.12.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	47
4.13.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	49
4.14.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	52
4.15.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin dokularında IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi.	54
4.16.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	55
4.17.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24	57

saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi.

- | | | |
|--------------|--|----|
| 4.18. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflamatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. | 58 |
| 4.19. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. | 60 |
| 4.20. | İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-1beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. | 61 |
| 4.21. | İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-1beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. | 63 |
| 4.22. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuvar sitokin olan IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. | 65 |
| 4.23. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin dokularında IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. | 67 |
| 4.24. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. | 69 |
| 4.25. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. | 71 |
| 4.26. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflamatuvar sitokin olan IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. | 72 |
| 4.27. | İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. | 74 |
| 4.28. | İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-6 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. | 76 |
| 4.29. | İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-6 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. | 77 |

4.30.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflatuvar sitokin olan TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	79
4.31.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi.	81
4.32.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	83
4.33.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi.	85
4.34.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	87
4.35.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, TNF-alfa protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi.	88
4.36.	İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	89
4.37.	İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	90
4.38.	İskemi modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	93
4.39.	İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	95
4.40.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflatuvar sitokin olan IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	97
4.41.	İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflatuvar sitokin olan TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	98
4.42.	İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	100
4.43.	İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-	102

10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	
4.44. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	103
4.45. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	105
4.46. İskemi modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	106
4.47. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	108
4.48. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	109
4.49. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi.	111
4.50. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-10 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	112
4.51. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında TGF-beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	113
4.52. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-10 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	115
4.53. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında TGF-beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi.	116
4.54. İskemi modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, Matriksmetaloproteinaz-9 (MMP-9) ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	118
4.55. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.	120
4.56. Kalıcı iskemi modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini	121

TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi.

- | | | |
|--------------|---|-----|
| 4.57. | İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. | 123 |
| 4.58. | Kalıcı iskemi modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. | 125 |
| 4.59. | İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. | 126 |
| 4.60. | Jelatinli zimografi jellerinde yürütülen proteinlerin görüntüsü. | 127 |
| 5.1. | Serebral iskemi ile inflamasyonun tetiklenmesi ve 12/15 LOX inhibisyonunun bu süreç üzerindeki etkisi. | 133 |

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	İmmünohistokimyasal analizler için kullanılan antikorlar.	17
3.2.	Kullanılan cihazlar	18
3.3.	Biyokimyasal analizler için kullanılan ELISA kitleri.	24
4.1.	NLRP1 inflamazom kompleksinin immünofloresan analiz sonuçları.	43
4.2.	NLRP3 inflamazom protein kompleksinin immünofloresan analiz sonuçları.	50



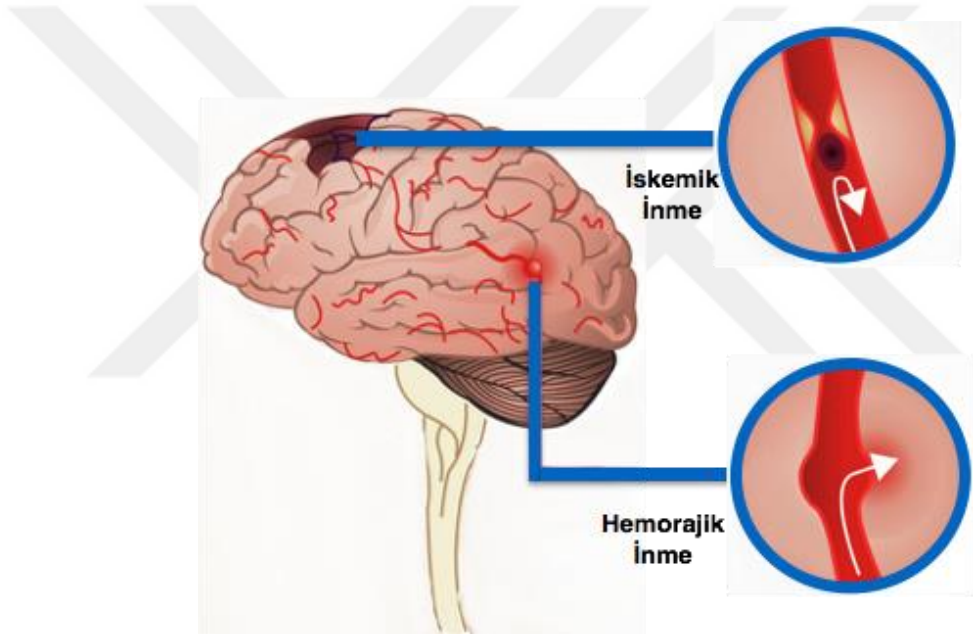
1. GİRİŞ

12/15 LOX'un ateroskleroz gelişimi, diyabet, inme, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve beyin iskemi-rekanalizasyon (İ/R) hasarında rolü olduğu bilinmektedir. Deneysel iskemi modellerinde 12/15 LOX inhibisyonunun erken dönemde enfarkt alanını küçülttüğü, beyin ödemi azalttığı, geç dönemde ise aksonal rejenerasyon ve revaskülarizasyon etkileri ile iyileşme sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir (1-7). Ancak, bu durumun beyin İ/R hasarı sonucu gelişen nöroinflamasyon sürecine etkisi çalışılmamıştır. Bu çalışmada 12/15 LOX inhibisyonunun deneysel iskemi modellerinde nöroinflamasyon üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

İnme tüm dünyada ikinci sırada gelen ölüm ve ilk sırada gelen yeti yitimi nedenidir. Her 4 dakikada bir kişi inme nedeniyle ölmektedir. Ölümün yanı sıra getirdiği kalıcı yeti yitimi nedeniyle ortaya çıkan ekonomik yük sağlık harcamalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle inme tedavileri üzerine yapılan araştırmalara özellikle önem verilmektedir. Buna rağmen günümüzde FDA tarafından onaylanmış tek tedavi seçeneği tPA' dır ve pek çok kısıtlılıkları vardır. Dar zaman penceresi nedeniyle tPA verilebilen hasta sayısının düşük olması, kanama riski nedeniyle ileri yaş hastalarda ve kronik hastalığı olanlarda kullanılamaması ve tPA sonrası oluşan komplikasyonlar bu kısıtlamalardan bazılarıdır. Bu nedenle inme tedavisinde yeni seçeneklerin oluşturulması önemlidir. Yeni tedavi hedeflerini saptayabilmek içinse inme patofizyolojisini iyi tanımak gereklidir. İnme sonrası oluşan nöroinflamasyonun patofizyolojideki rolü araştırılmaktadır. Yine membran lipidlerini yıkarak patofizyolojide etkili olan lipoksijenazların inhibisyonunun enfarkt hacmini azalttığı deneysel iskemi modellerinde gösterilmiştir. Ancak LOX inhibitörlerinin nöroinflamasyon üzerine olan etkileri bilinmemektedir. Bu soruya cevap arayan bu çalışmadan elde edilecek veriler, hem inme patofizyolojisini daha iyi anlamamızı hem de yeni tedavi hedefi olarak LOX inhibitörlerinin etki mekanizmasını genişletmemizi sağlayacaktır. Böylece tPA ile birlikte veya tek başına daha geniş tedavi penceresine ve daha düşük yan etki profiline sahip bir tedavi ajanı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre inme, ölümlerin ikinci en sık nedeni arasında bulunmaktadır (8). İnme nedeniyle yaklaşık sekiz kişiden biri (%11,9) hayatını kaybetmektedir (9). Mortalitenin yanı sıra kalıcı yeti yitimi oranı açısından özellikle gelişmekte olan ülkelerde inme birinci sırada yer almaktadır (10). Konuşma, denge, görme, yürüme, yutma ve idrar tutma gibi birçok fizyolojik durumu olumsuz yönde etkilemektedir (11). İskemik ve hemorajik olmak üzere iki tipi bulunan inme vakalarının, yaklaşık %85'ini iskemik inme oluşturmaktadır (12) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İskemik ve hemorajik inmenin şematik gösterimi.

İskemik inme beyin kan damarlarının trombus ya da emboli sonucu tıkanması ile karakterizedir (13). Beyindeki iskemik bölgenin yeri ve iskemi alanının boyutu tıkanan arterin türüne göre değişkenlik göstermektedir (14). İnme vakalarında genellikle orta serebral arter tıkanıklığı (OSAt) görülmektedir. İnsanda beyin damarlarının tıkanması geçici ya da kalıcı olabilmektedir. İnsandaki iskemik inme bulguları ile benzer klinik tabloyu oluşturabilmek için intra-luminal suture modeli, tromboembolik model, endotelin-1 modeli, elektrokoagülasyon ya da mekanik modeller ile geçici ya da kalıcı, proksimal ya da distal OSA hayvan modelleri

geliştirilmiştir (15). Bu modeller insandaki inme patalojisi ile oldukça benzer özellikler taşımaktadır. İn vivo iskemi modelleri arasında global iskemi, fokal iskemi ve hipoksi/iskemi olmak üzere üç farklı model bulunmaktadır (16). Fokal iskemik inme modeli, fare, sıçan gibi kemirgenlerde ve kedi, köpek gibi daha gelişmiş hayvanlarda kullanılabilen bir tekniktir. Bu teknikte tek taraflı OSA tıkanıklığı oluşturulmaktadır (17,18).

Bu teknikler arasında intra-luminal suture modeli geçici ve kalıcı OSA oluşturmak için yaygın olarak kullanılan bir modeldir (19). Fare ve sıçan gibi deney hayvanlarına uygulanabilir. Ayrıca iskemiden sonra rekanalizasyon oluşturmak bu modelle kolaylıkla yapılabilir. Nöroinflamasyon sürecinde gelişen hücre ölümü, glial hücre aktivasyonu, kan beyin bariyeri hasarı gibi süreçlerin incelenebilmesi açısından da uygun bir modeldir (19).

Distal OSA tıkanma (dOSAt) yöntemleri ise insanlarda oluşan OSA tıkanıklıklarını modellediğinden ve daha az serebral ödeme neden olarak mortaliteyi azalttığı için tercih sebebi olmuştur. Bunlardan $FeCl_3$ ile distal OSA tıkanma modeli ucuz, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir model olarak literatürde kabul görmüştür (20). Bu çalışmada proksimal OSA iskemi/rekanalizasyon modeli ve distal OSA iskemi fare modelleri oluşturulmuştur. İskemi/rekanalizasyon modelinde damar proksimal bölgeden, iskemi modelinde ise distal bölgeden tıkanmıştır. Tıkanmadaki bu bölgesel farklılık iskemiden etkilenen beyin bölgesinin alanını değiştirmektedir. OSA'nın proksimal bölgesi beynin daha geniş bir alanını suladığı için, bu bölgenin tıkanması distal modele göre daha yaygın bir hasar oluşturmaktadır.

2.1. Serebral İskemi ve Nöroinflamasyon

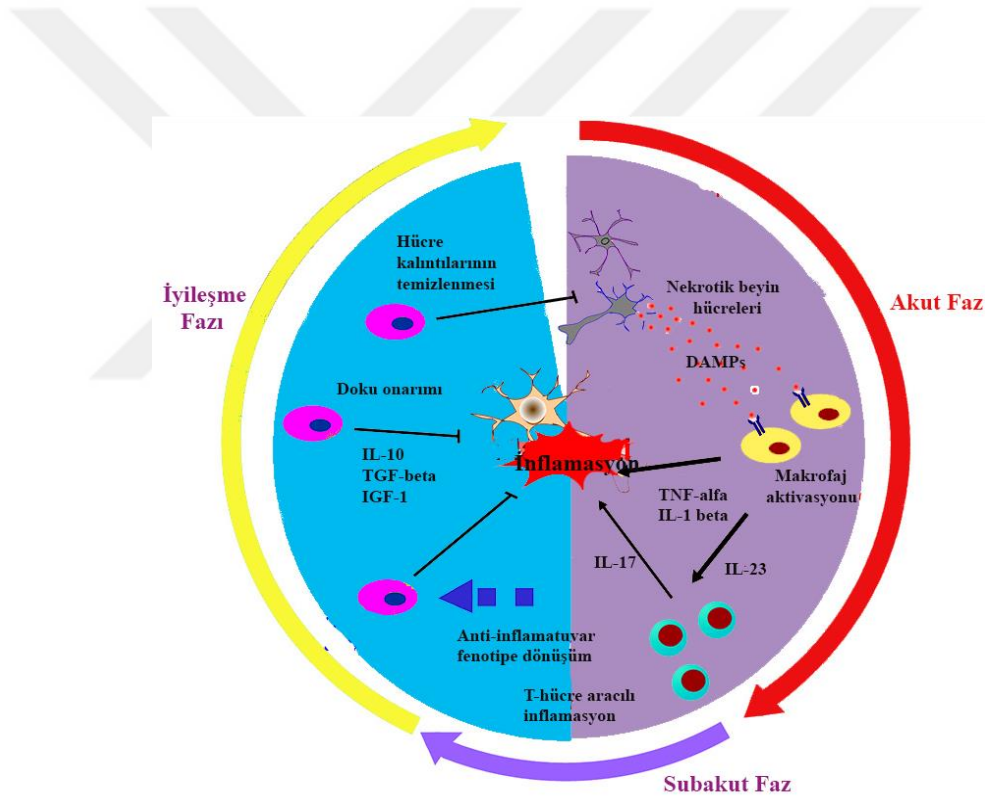
İskemik inme sonrası, nöron hücre ölümü ve özellikle nekrotik hücre kalıntıları inflamasyonu güçlü şekilde tetikleyerek, fagositik hücrelerin aktifleşmesine neden olmaktadır (21). Post-iskemik inflamasyon iskemik inme patolojisinin en belirgin özelliğidir (22,23). Beyin dokusunu besleyen damarlarda kan akımının azalması ile dokular yeterli oksijen ve enerji sağlayamaz (24). Hücre ATP seviyesinin düşmesi sonucu sinaptik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu bozulur. Hücre dışında biriken glutamat glutamat reseptörlerine bağlanarak daha

fazla aktivasyona yol açar. Bu durum literatürde glutamat toksisitesi olarak bilinmektedir. Bu aşırı aktivasyon durumu NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörleri ve voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre içine yoğun Ca^{++} iyonu akışına yol açar. Mitokondrilerin işlevini yitirmesi, hücrel kalsiyum homeostazının bozulması ve enerji yetersizliğinin bir sonucudur. Mitokondriyal disfonksiyon, hücre içi kalsiyum artışı, siklooksijenaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin aktivasyonu ise hücrel proteinler, DNA ve membran lipitlerine zarar veren serbest radikallerin üretimine yol açar. Nöronlarda oluşan oksidatif stresin en önemli etkisi, toksik etkiye sahip aldehitlerin üretimine neden olan membrane lipitlerinin perokside olmasıdır (25). Bunun sonucunda da etkilenen bölgede hücre ölümü gerçekleşir. Katostrafik hücrel olaylardan sonra hasar gören hücrelerden, hücre dışına sitoplazmik proteinler, ATP, DNA/RNA, gibi yapılar salınır. Bu hücrel kalıntılar tehlike sinyali (DAMPs) olarak adlandırılır ve hasarlı dokulara karşı infeksiyöz olmayan immünolojik yanıtı uyarır (26,27). DAMP'lar hücre tipine göre çeşitlilik göstermektedir. Bu moleküller arasında özellikle HMGB1, ATP ve S100 merkezi sinir sistemi hasarından sonra immünolojik yanıtı başlatan hücrel kalıntılardır (28). Beyin ve periferdeki doğal bağışıklık hücreleri farklı fenotiplere sahip olmalarına rağmen, tümü DAMP'lara PRR (*Pattern recognition receptor*) reseptörleri aracılığı ile yanıt oluşturur. PR reseptörlerinin uyarılması ile NF-kB sitoplazmadan nükleusa geçer ve pro-inflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu indükler (29).

Ayrıca, serebral iskemide nöron ve glial hücre ölümüne neden olan inflamasyon sürecine, inflamazom adı verilen çoklu protein kompleksleri de aracılık etmektedir. İnflamazomlar doku hasarını algılayan sensörler gibi davranmaktadırlar. Bu kompleks yapıda olan proteinler, perifer dokularda pro-inflamatuvar sitokin üretimi ve salınımını arttırmaktadır. İnflamasyon sürecinde glia ve lökosit hücreleri tarafından çok sayıda sitokin, kemokin ve prostaglandin gibi proinflamatuvar mediyatör üretilmektedir (30,31).

2.1.1. İskemik İnmede İnflamatuvar Mediyatörlerin Rolü

İskemi ile beyinde indüklenen inflamasyon sürecine, beyinde yerleşik olan glial hücreler ve sistemik dolaşımdan beyin dokusuna infiltre olan bağışıklık hücreleri katılmaktadır. Bu hücreler tarafından üretilen inflamatuvar mediyatörler, serebral iskeminin patofizyolojisinde merkezi rol oynamaktadır. IL-1 beta, IL-6 ve TNF-alfa gibi pro-inflamatuvar sitokinler inflamasyonun erken döneminde aktif rol alırken, inflamasyonun çözülmesinde görevli olan TGF-beta ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler inflamasyon sürecinin geç dönemine katılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İnflamasyonun farklı süreçlerinde görevli sitokinler (32).

Proinflamatuvar sitokinler arasında IL-6 iskemik inmede en erken aktive olup, salınan bir sitokindir (33). Literatürde IL-6'nın aşırı inflamatuvar yanıtı yol açmasının yanında, sıçan inme modelinde insan-rekombinant IL-6 uygulamasının iskemik hasarı önemli oranda azalttığına yönelik bulgular da mevcuttur (34). TNF-

alfa ise hem kalıcı iskemi hem de iskemi/rekanalizasyon modellerinde beyin dokusunda artan güçlü bir pro-inflamatuvar sitokindir. TNF-alfa ifade artışı iskemiden ilk olarak 1-3 saat sonra, ikinci artış ise 24-36 saat sonra olmaktadır (34,35). IL-6 gibi TNF-alfa da nörotoksik etkisinin yanında nöroprotektif etki de göstermektedir (36,37). Kültür nöronlarına hipoksi öncesi TNF-alfa verilmesi, hipoksik hasara karşı nöronların toleransını arttırarak koruyuculuk sağlamıştır (38). Fakat literatürde TNF-alfa'nın nörotoksik etkisini destekleyen daha çok çalışma mevcuttur. Örneğin, kronik TNF-alfa ifade artışının serebral iskemi riskini arttırdığı (39), TNF-alfa reseptörünün *knockout* olduğu farelerde ise serebral iskemiyeye karşı koruyuculuğun arttığı gösterilmiştir. TNF-alfa'nın iki etkiye sahip olması TNF-R p55 ve TNF-R p75 gibi farklı reseptörlere sahip olmasından kaynaklanabilir (40).

IL-1 ailesinin IL-1 alfa ve IL-1beta olmak üzere iki izoformu vardır. Bu proinflamatuvar sitokinler inme dahil olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır (41). IL-1alfa'nın öncü formu biyolojik olarak aktif iken, IL-1beta'nın öncü formu yeterli biyolojik aktiviteye sahip değildir. Öncü IL-1beta proteaz enzimleri tarafından kırılarak aktif formuna dönüşür. IL-1alfa/beta *knockout* farelerde yapılan OSA tıkanması sonrasında, oluşan doku hasarının önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (42). Sonuç olarak, IL-6, TNF-alfa, IL-1 gibi çeşitli sitokinler iskemik beyin hasarına cevap olarak hem merkezi sistemi hem de periferik sistem de artış göstermektedir. Bu sitokinlerden TNF-alfa ve IL-6 gibi iki farklı etkiye sahip sitokinler, oluşan hasarın farklı fazlarına bağlı olarak farklı etkiler göstermektedir.

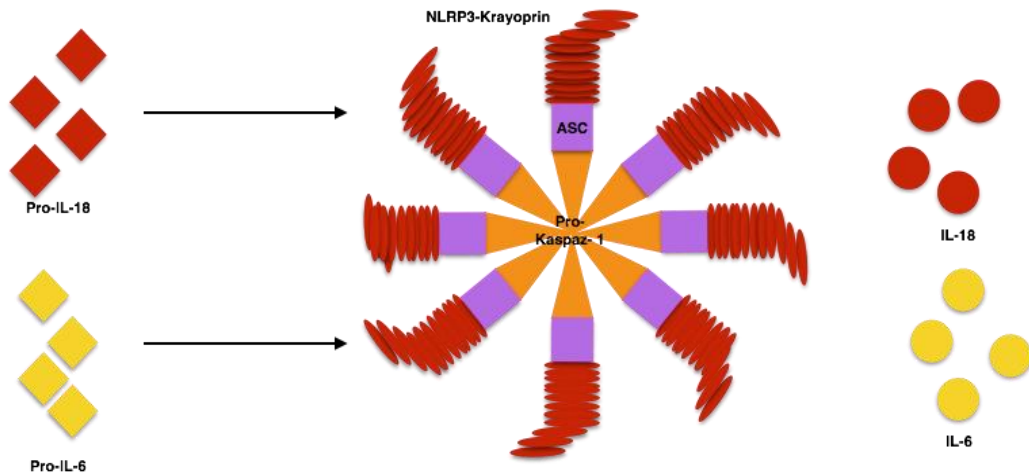
Anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 başlıca Th-2 lenfositleri olmak üzere, monosit/makrofaj hücreleri tarafından üretilmektedir. IL-1 ve TNF-alfa'yı inhibe etmesinin yanında hem sitokin reseptörlerinin ifadesini hem de reseptör aktivasyonunu azaltabilir. Klinik öncesi çalışmalarda OSA tıkanıklığı oluşturulmuş IL-10 eksikliği bulunan farelerde lezyon boyutunun normal farelerde OSA tıkanıklığı oluşturulan farelere göre daha fazla olduğu saptanmıştır (43).

Diğer anti-inflamatuvar TGF-beta sitokininin TGF-beta1, 2, 3 olmak üzere 3 farklı izoformu bulunmaktadır. Bütün izoformlar tek bir reseptör üzerinden etki etmektedir. İnme sonrası TGF-beta mRNA düzeyinin 1-6 saat içinde artış gösterip,

15 güne kadar yüksek seviyede kaldığı belirtilmektedir (44). TGF-beta hem nöroprotektif hem de anti-inflamatuvar etkiye sahiptir. Bu nedenle inme de iyi bir hedef molekül olabileceği düşünülmektedir. TGF-beta aşırı ifade edildiğinde iskemiye bağlı doku hasarının ve inflamasyonun azaldığı (45), TGF-beta blokajının ise iskemik beyin hasarını şiddetlendirdiği gösterilmiştir (46). Ayrıca deneysel modellerde iskemik kor bölgesine TGF-beta enjeksiyonunun nöroprotektif etki göstermeyip, penumbraya enjekte edilen TGF-beta'nın koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (47).

2.1.2. İskemide İnflamazomların Rolü

Merkezi sinir sisteminde (MSS) doğal bağışıklıktan (innate) sorumlu hücreler mikroglialar, astrositler ve sistemik dolaşımdan gelen makrofajlardır (48). Doğal bağışıklık hücreleri ile infiltre olan kazanılmış bağışıklık hücrelerinin (adaptif) her biri MSS'de gelişen inflamasyona katkıda bulunmaktadır. İnfeksiyöz ya da inme, multiple skleroz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi infeksiyöz olmayan patolojilerde doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi birlikte etki göstermektedir (49,50). Biyolojik nedenlere göre, MSS inflamasyonları organizmada patojenik ya da koruyucu etkiler oluşturabilir (51). Son yıllarda keşfedilmiş olan ve inflamazom olarak adlandırılan proteinler inflamasyonun başlaması için gerekli olan sitozolik çoklu protein kompleksleridir. İnflamazom kompleksleri genellikle üç temel yapıdan oluşmaktadır; sitozolik motif tanıyan reseptör, kaspaz 1 enzimi ve bu iki yapı arasındaki etkileşimi kolaylaştıran adaptör protein (52) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İnflamazom kompleksinin bileşenleri (Aktaş, C.Ç., tarafından çizilmiştir).

Bu bileşenlerin biraraya gelmesi ile proinflatuvar kaspazlar (özellikle kaspaz 1) aktive olur. Aktifleşen kaspazlar ise potent inflamatuvar yanıtı oluşturan pro-inflatuvar sitokinlerin salınımına ve kırılımına yol açar (53).

İnterlökin (IL)-1beta, biyolojik olarak aktif olmayan pro-formunda üretilmektedir (pro-IL1beta). Aktivasyonu ve hücre dışına salınımı için kaspaz 1 enzimi gerekmektedir. Kaspaz 1 aktivitesi ise mikrobiyal bileşenler ve steril tehlike sinyalleri için sensör işlevi gören inflamazom proteinleri tarafından kontrol edilir (54).

(IL)-1beta, tümör nekrotizan faktörü-alfa (TNF-alfa) ve IL-23 gibi miyeloid hücreler tarafından salınan sitokinler ve IL-17, IL-21 gibi T-hücre kökenli sitokinler beyin doku hasarını arttırdıkları için iskemik inme tedavisinde potansiyel hedef haline gelmişlerdir (55–57). Günümüzde inme gibi inflamasyonu tetikleyen hastalıkların tedavisinde, anti-inflatuvar tedavi hedefleri önem kazanmıştır. Bu hedefler arasında 12/15 lipoksijenaz enzimi bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır.

2.1.3. Serebral İskemide Akut, Subakut ve Kronik Fazlar

İskemik inmeden sonraki patolojik süreç akut (dakika-saat) subakut (saat-gün) ve kronik (gün-ay) olmak üzere 3 fazda incelenebilir. Akut fazda hasarlı beyin

dokusu tarafından ROS, pro-inflamatuvar sitokin ve kimokinler hızlıca üretilerek hücrelerarası kompartmanlara salınır (58). Bu mediyatörler beyindeki endotel hücrelerini aktive ederek serebral endotelyumdaki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler. Böylece dolaşımdaki nötrofiller damar endoteline tutunup damar dışına göç ederler. Kan beyin bariyerini geçip beyin parankimine ulaşırlar (58).

Subakut fazda, infiltre olan nötrofiller tarafından sitokinler, kimokinler, ROS ve matriksmetalloproteazlar (MMP) gibi çok çeşitli proinflamatuvar mediyatör salınır. Bu moleküllerin salgılanması kandaki lökosit infiltrasyonunu artırır ve beyin hücrelerinin aşırı aktivasyonuna yol açar. Tüm bu değişimlere cevap olarak, kan beyin bariyeri (KBB) hasarı, beyin ödemi, nöron hücre ölümü ve hemorajik transformasyon şiddetlenir (59,60).

Kronik fazda ise postiskemik inflamasyonun doku onarımı ve fonksiyonel iyileşmeyi uyardığı düşünülmektedir (59). Bu nedenle, iskemi sonrası gelişen inflamasyonun, iskemik inmenin farklı fazlarındaki nörotoksik ve nöroprotektif etkileri arasındaki dinamik dengenin iyi anlaşılması gerekmektedir (61). Bu bilgilere dayanarak, bu tez çalışmasında kalıcı iskemi veya iskemi/rekanalizasyon ile beyinde indüklenen inflamasyon, 6, 24 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman noktasında incelenmiştir.

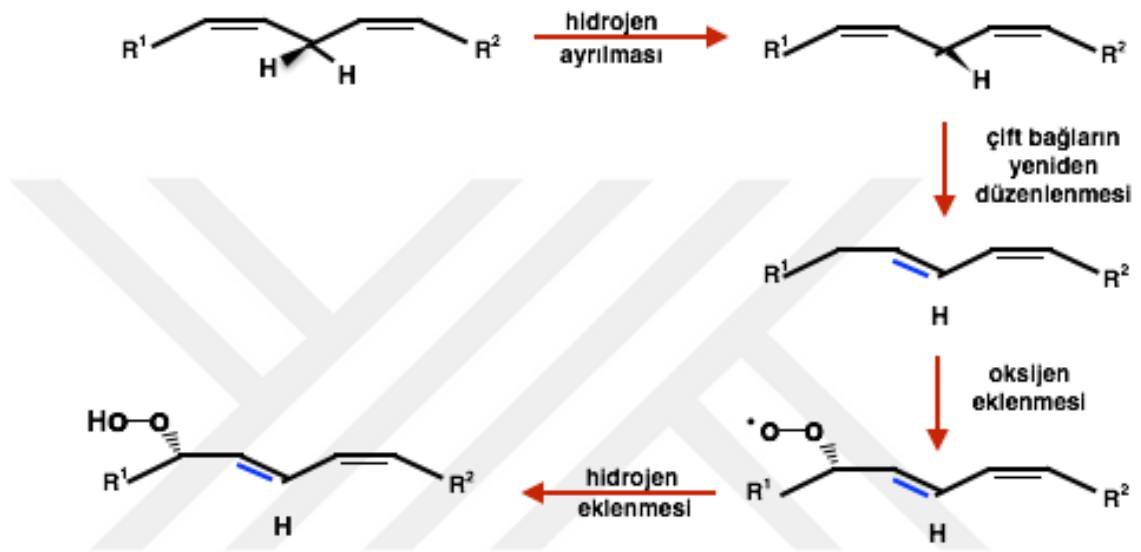
2.2. Lipoksijenazlar

Lipoksijenazlar membrane lipitlerinden serbestleşen çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Yağ asiti metabolitleri hem fizyoloji hem de patofizyolojide rol oynamaktadır. Bu metabolitler özellikle konak savunma reaksiyonlarında ve inflamasyon sürecinde etkindirler.

2.2.1. Lipoksijenazların Katalitik Özellikleri

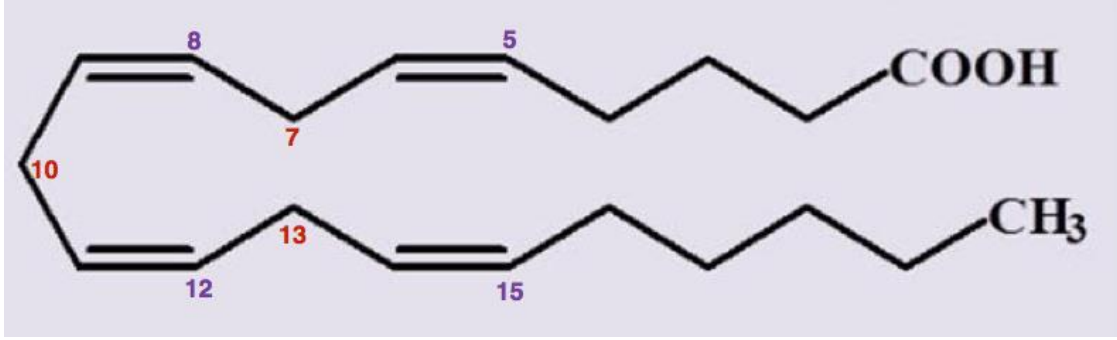
Lipoksijenazlar (LOX) yapısında hem grubu olmaksızın demir içeren enzim ailesindendir. Reaksiyon döngüsünün ilk basamağı bir hidrojen radikalının serbestleşmesidir. Bu reaksiyon yağ asitinin allilik pozisyonunda iki çift bağın

varlığını gerektirmektedir. Yani, yağ asitinin lipoksijenaz substratı olabilmesi için en az iki çift bağ içermesi ve bu iki çift bağ arasında bir metilen grubu taşıması gerekmektedir. İkinci reaksiyon basamağında çift bağlardan biri yeniden düzenlenerek, çift bağlar trans konfigürasyonunda pozisyon alır ve bir konjüge dien sistemi oluşur. Reaksiyonun son basamağı sırasıyla yapıya bir oksijen molekülü ve hidrojen atomunun katılımı ile tamamlanır (62) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Lipoksijenazların çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyon mekanizması.

Araşidonik asit en önemli lipoksijenaz substratı olarak kabul edilmektedir. C(7), C(10) ve C(13). Pozisyondaki karbon atomlarına bağlı hidrojen atomları lipoksijenaz reaksiyon döngüsünün ilk reaksiyon basamağı için muhtemel hedeflerdir. Bu bölgelerdeki H atomlarının yapıdan ayrılması sonucu oksijen molekülünün eklenmesi için 6 olası bölge oluşturur. Memeli hücrelerinde 5, 8, 12 ve 15. bölgelerde oksijen eklenmesi gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Lipoksijenaz enziminin araşidonik asit yapısında oksijen eklenmesini katalizleyebildiği, olası karbon bölgeleri. Reaksiyon esnasında 7, 10 ve 13. pozisyondaki karbon atomları ise hidrojen atomlarının yapıdan ayrılma pozisyonlarıdır.

Lipoksijenazlar, araşidonik asit karbon iskeletinde oksijen eklemesini kaçınıcı karbon atomu üzerinden katalizlediğine göre isimlendirilirler. Oksijen eklenme pozisyonu ise türler arasında farklılık göstermektedir.

2.2.2. Lipoksijenaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Lipoksijenazlar katalitik ve düzenleyici olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Gevşek formda bulunan LOX'ların katalitik döngüye girmesi için enzimin aktif bölgesinde bulunan demir iyonunun ferröz formdan ferrik forma okside olması gerekmektedir. Enzim, substratın C-H bağına moleküler oksijen ekleyerek kararsız yapıda hidroperoksitleri üretir. Hidroperoksitler çok sayıda reaksiyona katılabilen moleküllerdir. Lipit hidroperoksitler (ROOH) arasında, 5- ve 12-hidroperoksi eikozatetraenoik asit (HETE) ve 13-hidroperoksi oktadekadienoik asit, lipoksijenazları aktive edebilirken, hidrojen peroksit ve birkaç başka organik hidroperoksit bu açıdan etkin değildirler. Bu durum hidroperoksitlerin lipoksijenaz aktivatörü olarak işlev görmek üzere, farklı yapısal özelliklere gereksinim duyduğunu göstermektedir (63).

Genel olarak, lipoksijenaz enzimleri hücresel olaylar tarafından sıkı kontrol altındadır. Hücre içi kalsiyum seviyesi, membran lipitleri, ATP, diaçilgliseroller, fosfatidilinozitol türevleri, enzim fosforilasyonları ve lipoksijenazlar ile etkileşime giren proteinlerin lipoksijenaz aktivitesinin düzenleniminde gerekli olduğu

belirtilmektedir (64).

2.2.3. Lipoksijenazların Fizyolojik ve Patofizyolojik Rolü

Serbest yağ asitleri çoğu hücrede kısıtlı miktarda tutulmaktadır. Birçok LOX izoformu, siklooksijenazlar ve sitokrom p450 enzimleri substrat olarak hücre içi lipitleri kullanmaktadır (65). Fakat 12/15 LOX gibi bazı LOX izoformları biyolojik zarlar ya da lipoproteinlerdeki lipit esterleri şeklinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini oksitleyebilme yetisine sahiptir (66–68). 12/15 LOX zara bağlandığı zaman, ER ve mitokondri de dahil olmak üzere, organellerin luminal boşluğundan suda çözünebilen proteinlerin geçişine olanak sağlayan porlar oluşturularak biyolojik zar yapılarını doğrudan etkiler (69,70).

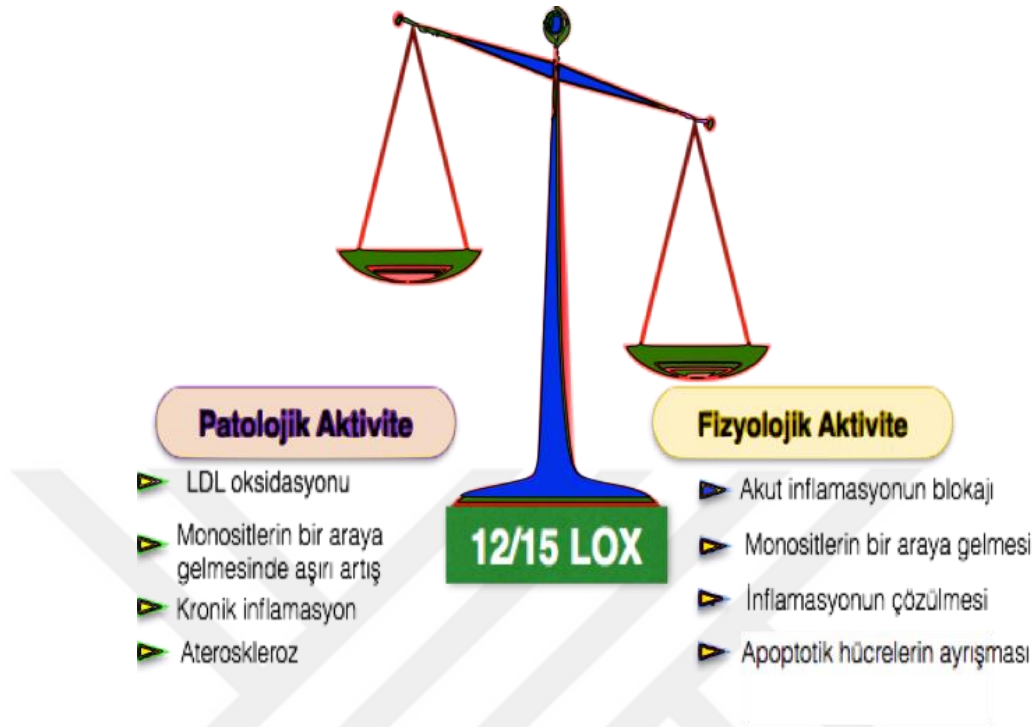
Deneyssel inme modellerinde, oksidatif stres ile ilişkili çeşitli yollar aktive olarak, iskemi/rekanalizasyon (İ/R) hasarında artışa neden olmaktadır (71–73). 12/15 LOX protein ekspresyonu hem nöronlarda hem de enfarkt alanını çevreleyen endotel hücrelerinde artış göstermektedir (74). Ayrıca enzim aktivitesinin iskemik fare beyinde arttığı belirtilmiştir. Bu aktivasyonu penumbra gecikmiş hücre ölümü, kan-beyin bariyeri hasarı ve ödem oluşumu izlemektedir (74). Bununla birlikte, 12/15 LOX doğrudan lipit peroksidasyonuna neden olduğu için iskemik beyin hasarında major etki oluşturmaktadır. 12/15 LOX ve 5-LOX dışında varolan diğer LOX'ların ise beyindeki ekspresyonları düşüktür (30).

İnflamasyon esnasında substrat profili 12/15 LOX'un işlevi bakımından oldukça önemlidir. Örneğin beslenme şekline bağlı olarak substrat profilinin değişmesi, 12/15 LOX'un lipit oksidasyon ürünlerinin spektrumunu değiştirerek, pro-inflamatuvar mediyatörlerin anti-inflamatuvar mediyatörlere göre daha fazla üretilmesine neden olur. Kısaca, LOX ürünleri hem akut inflamasyonun gelişiminde hem de inflamasyonun çözünmesinde görevlidir (Şekil 2.6) (31).

2.2.4. 12/15 Lipoksijenaz ve Serebral İ/R Sürecine Etkisi

Memelilerde lipoksijenaz enzimleri çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) substrat olarak kullanırlar. Bu enzimlerin sınıflandırılmasında özellikle araşidonik

asidin oksijenlenme pozisyonu seçicilik sağlar.



Şekil 2.6. Fizyolojik 12/15 LOX aktivitesi inflamasyonun çözünmesinde etkili olurken, enzim aktivitesinin değişmesi kronik inflamasyon sürecinin ilerlemesine yol açar (31).

Serebral iske mi-rekanalizasyon süreci inflamasyon ve lipit peroksidasyonunu tetikleyerek doku hasarına neden olmaktadır (75). Yapılan çalışmalarda iskemik beyin dokusunda serbest araş idonik asit miktarında artış olduğu tesbit edilmiştir. Araş idonik asit özellikle fosfolipaz A₂ gibi fosfolipazlar aracılığı ile membran yapısındaki fosfolipitlerden serbestleşir (76). Bu artışa ba ğlı olarak araş idonik asiti substrat olarak kullanan lipoksijenaz enzim aktivitesi de artmaktadır.

İnsan LOX enzimleri ve onların metabolitleri birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır. LOX izozimleri arasında 5-LOX kanser (77), astım (78), alerjik rinit (79), osteoartrit (80), ateroskleroz (81) ve kronik tıkayıcı akci ğer hastalığı (82) patogene zinde rol alırken trombositlerde ifade edilen 12-LOX, kan pıhtılaşması (83) ve Diyabetes Mellitus (84), psöriyazis (85), kanser (86) gibi birçok hastalığın patolojisinde etkili olmaktadır. İnsan retikülosit 15-Lipoksijenaz-1 (kemirgenlerdeki ortolo ğu 12/15 LOX) ise özellikle aterogene z (87), Diyabetes Mellitus (88), Alzheimer Hastalığı (89), yenido ğan periventriküler lökomalazisi (26),

meme kanseri (90) ve inme (2) gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı için önemli bir tedavi hedefi haline gelmiştir.

2.2.5. Güçlü ve Selektif İnsan 12/15 LOX İnhibitörü: *ML351*

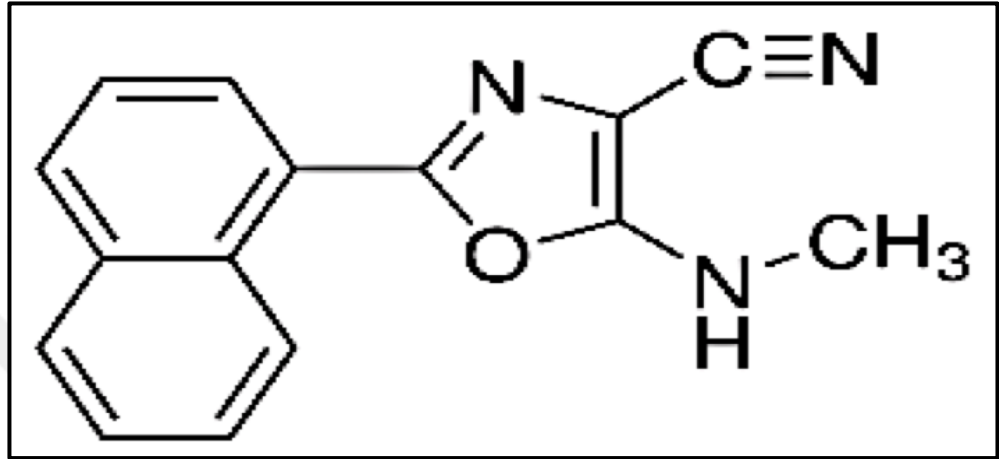
12/15 LOX enziminin inme hastalarında arttığı bilinmektedir (2). Geliştirilen LOX inhibitörlerinin enfarkt alanı, kan-beyin bariyerinin geçirgenliği, ödem oluşumu gibi inmede gelişen patolojileri azalttığı görülmüştür (91,92). Genel iskemi vakalarında tPA ile tedavi penceresinin kısa olması tPA ile tedavi olabilen hastaların yüzdesini kısıtlı kılmaktadır. Bu nedenle tüm iskemi vakalarının sadece %15'inden az bir kısmı tPA ile tedavi edilebilmektedir (93).

Bu sebeple, tedavi penceresi 4.5 saatten uzun, kan-beyin bariyerini geçebilen ve hedef doku üzerinde etkili olan yeni ilaçlara gereksinim vardır. İnsan 12/15 LOX inhibitörleri geliştirilirken türler arasında çeşitlilik gösterdiği dikkate alınmalıdır. Hem insan hem de farede 12/15 LOX geni ALOX15 olarak ifade edilir. Her iki türde de yaklaşık %78 oranında homoloji ve işlevsel benzerlik bulunmaktadır. 12/15 izozimleri substratı hem 12 hem de 15. karbon atomlarından okside edebilmektedir. Buna göre, insan 12/15 LOX tarafından baskın olarak 15-HETE üretilirken, fare 12/15 LOX tarafından 12-HETE üretilmektedir (94).

Substrat özgüllüğündeki bu farklılık nedeniyle geliştirilen inhibitörler izoforma özgü, yani insan 12/15 LOX'a seçiciliği olup faredeki ortologunu hedeflemeyen inhibitörlerdir. İzofoma spesifik inhibitörler küçük-hayvan inme modellerinin kullanımını kısıtlayan önemli bir nedendir. Bu gereksinimden ötürü boswelik asit ($IC_{50} = 1 \mu M$) (95), nordihidroguaiaretik asit ($IC_{50} = 0,11 \mu M$) (96) ve baikalein ($IC_{50} = 1,6 \mu M$) (95) gibi güçlü ve selektif insan 12/15 LOX inhibitörleri geliştirilmiştir. Fakat bu inhibitörlerin çoğu indirgeyicidir ve yeterince selektif olmadıklarından istenilen verime ulaşamamıştır.

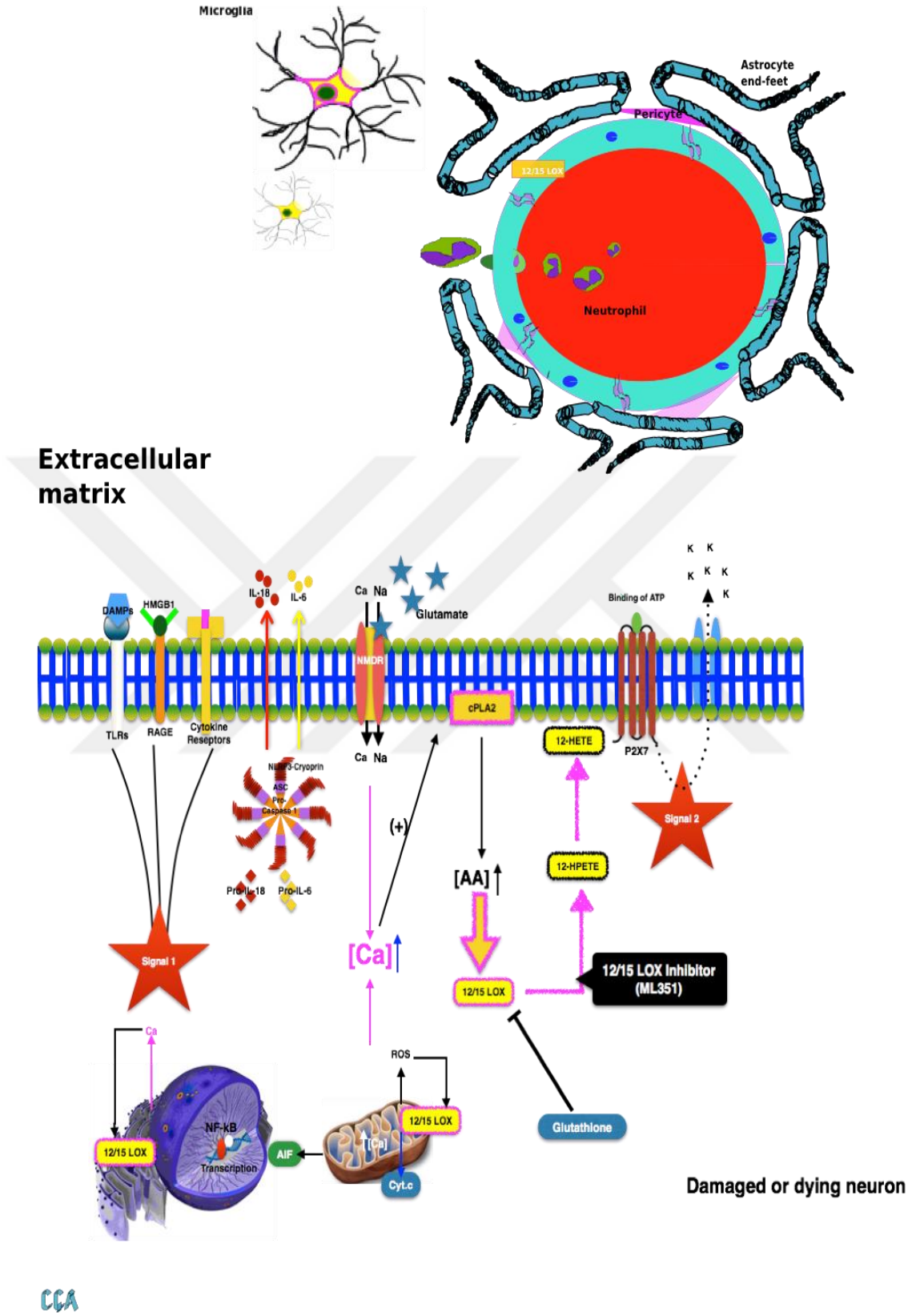
Daha sonra bilgisayarlı havuz analizleri kullanılarak LoxBlock-1 gibi yeni indirgeyici olmayan inhibitörler sentezlenmiştir. Fakat bu bileşiklerin de seçiciliğinin ve etki gücünün zayıf olduğu belirlenmiştir (97). Bristol-Myers Squibb (BMS) ve Pfizer gibi çeşitli ilaç firmaları tarafından triptamin, imidazol, pirazol temelli bileşikler geliştirilmiştir (98,99). Bu bileşikler tavşan 12/15 LOX'a karşı nanomolar

konsantrasyonlarda etki gösterip, hem 5-LOX hem de 12-LOX'a karşı oldukça yüksek seçicilik göstermiştir. Fakat çözünürlük ve LogP gibi uygun fiziksel özelliklere sahip olmadıklarından in vivo koşullarda kullanımı mümkün olmamıştır (98,100). Daha sonra van Leyen ve ark. tarafından *ML351* isimli yeni bir bileşik geliştirilmiştir. Şekil 2. 7'de bileşiğin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.7. *ML351* bileşiğinin kimyasal yapısı.

Bu bileşiğin çözünürlük, mikrozomal kararlılık ve KBB'yi geçme gibi özellikleri bakımından gelişmiş biyolojik modellerde kullanımı mümkündür. Bu nedenle çalışmamızda 12/15 LOX inhibisyonu için *ML351* bileşiği seçilmiştir (15).



Şekil 2.7. İnflamasyonda 12/15 lipoksijenaz enzimi ve inhibitör bileşiği ML351'in moleküler mekanizması (Aktaş, C.Ç., tarafından çizilmiştir).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

İmmunohistoloji deneylerinde kullanılan primer antikorlar Tablo 1’de özetlenmiştir. Doku kesitlerinin alındığı lamalar Poli l-lizin (Sigma) çözeltisi ile kaplanmıştır. IHC deneylerinde kullanılan diğer sarf malzemeleri; Sukroz (Sigma) Hoechst 33258 çekirdek boyası (Thermofisher), Toz Tris Tamponu (Thermofisher), Toz PBS tampon (Biowest), Bovine Serum Albümin (Biowest), PFA, İpek iplik 4/0, Ethilon 8/0, İpek iplik 6/0, DMSO (Thermo Fisher) , Sodium deoxycholate (Sigma), Forane Likid 100 ml İzofloran (Abbott), İzotonik Sodyum Klorür (%0.9) (Polifarma). Örneklerdeki protein miktarını ölçmek için BCA Protein Assay Kiti (Pierce) kullanılmıştır. İmmunohistokimya deneylerinde kullanılan antikorlar ve serumlar Tablo 3.1’ de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. İmmunohistokimya için kullanılan antikorlar

PrimerAntikorlar	Kaynak	Hedef	Poliklonal/ monoklonal	Uygulanan dilüsyon oranları	Üretici Firma
Anti-TIMP-1 antibody	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:100	Abcam,
Anti-MMP-9 antibody	Tavşan	Fare	Monoklonal	1:100	Calbiochem,
Anti-IL-10 antibody	Sıçan	Fare	Monoklonal	1:100	Abcam,
Anti-TGF-beta antibody	Fare	Fare	Monoklonal	1:100	Abcam,
Anti-IL-6 antibody	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:50	Abcam,
Anti-IL1 beta antibody	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:50	Abcam,
Anti-TNF alpha antibody	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:50	Abcam,
anti-NLRP3/NALP3, mAb (Cryo-2)	Fare	Fare	Monoklonal	1:100	Adipogen,
NALP1 Antibody (M- 90)	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:100	SantaCruz,
Anti Iba1	Tavşan	Fare	Poliklonal	1:100	Wako,
Sekonder Antikorlar					
(Alexa Fluor® 488)	Keçi	Tavşan		1:200	Molecular Probes, USA
(Alexa Fluor® 488)	Keçi	Sıçan		1:200	Molecular Probes, USA
FITC	Eşek	Keçi		1:200	SantaCruz,
(Alexa Fluor®)	Eşek	Tavşan		1:200	
Serumlar					
Normal Keçi Serumu				%10	Jackson Immuno Research
Normal Eşek Serumu				%10	Jackson Immuno Research

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma
Hassas Terazi	Shimadzu-AUX220,
Vorteks	Nüve-NM110,
Distile Su Cihazı	Mp Minipure Basic,
Blood Flow Meter, Lazer Doppler	AD Instruments
Anestezi ve Oksijen makinesi	AMS-Minor 612,
Stereotaksi	WPI,
Elektrikli battaniye	Kent Scientific,
pH ölçer	Thermo-Orion3Star,
Krayostat	Leica-CM1100,
MikroPlate Okuyucu	Molecular Devices,
Floresan-Işık mikroskobu	Nikon- E600,
Stereomikroskop	Nikon SMZ 745T
Konfokal Mikroskop	Leica TCS SP8,

3.2. Yöntemler

Deneylerde ortalama ağırlıkları 30-40 gram olan, 9-12 haftalık 85 adet Swiss albino cinsi erkek fareler kullanıldı. Fareler rastgele ve eşit sayıda (n=3) 5 gruba ayrıldı. Fareler deney öncesi 7 gün süre ile kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, 24-26 °C oda sıcaklığında ve % 50-60 nem oranı koşullarında barındırıldı. Farelerin beslenmesinde standart koşullar uygulandı. Fareler cerrahi işlem öncesinde, %4 izofloran inhalasyonu ile uyutuldu. Anestezinin idamesi için cerrahi işlem süresince izofloran dozu %1-2 arasında tutuldu. Homeotermik battaniyeye bağlı olan rektal ısı probu sayesinde işlem boyunca, farelerin vücut sıcaklıkları 37 °C'de tutuldu. Pulse oksimetre ile deney süresince oksijen saturasyonu ve nabız monitorizasyonu yapıldı. İmmünohistokimyasal işaretleme ve ELISA tayinleri için her grupta 10 adet fare kullanıldı.

Grup 1: Proksimal OSA iskemi-rekanalizasyon modeli oluşturuldu. 60 dakika iskemi sonrası rekanalizasyon uygulanan farelere 50 mg/kg dozda 12/15 LOX inhibitörü intraperitoneal yolla enjekte edildi. İskemiden 6, 24 ve 72 saat sonra fareler kurban edildi.

Kontrol 1: Proksimal OSA iskemi-rekanalizasyon modeli oluşturuldu. 60 dakika iskemi sonrası rekanalizasyon uygulanan farelere 12/15 LOX inhibitörünün

çözücüsü olan 0,1 ml DMSO intraperitoneal yolla enjekte edildi. İskemiden 6, 24 ve 72 saat sonra fareler sakrifiye edildi.

Grup 2: % 30 FeCl₃ ile kalıcı distal OSA tıkama modeli oluşturuldu. İskemiden 60 dakika sonra farelere 50 mg/kg dozda 12/15 LOX inhibitörü intraperitoneal yolla enjekte edildi. İskemiden 6, 24 ve 72 saat sonra fareler sakrifiye edildi.

Kontrol 2: % 30 FeCl₃ ile kalıcı distal OSA tıkama modeli oluşturuldu. İskemiden 60 dakika sonra farelere 12/15 LOX inhibitörünün çözücüsü olan 0,1 ml DMSO intraperitoneal yolla enjekte edildi. İskemiden 6, 24 ve 72 saat sonra fareler sakrifiye edildi.

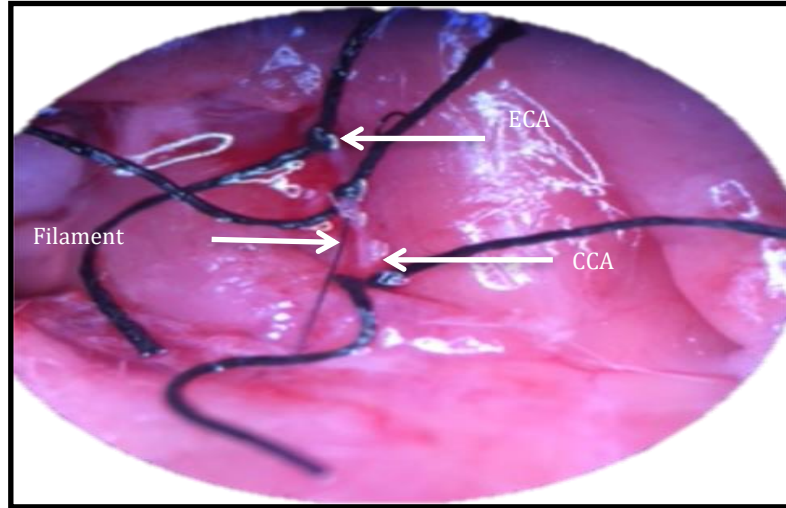
Naif deney grubu: İskemi yapılmayan bu grup anestezi altında sakrifiye edilip kontrol olarak kullanıldı.

3.2.1. Orta Serebral Arter Oklüzyonu

Sağ serebral arter oklüzyonunun doğruluğunu kanıtlamak için kafatasına lazer Doppler probu yerleştirilerek, kortikal kan akımı ölçüldü. Homeotermik battaniyeye bağlı olan rektal ısı probu sayesinde işlem boyunca, farelerin vücut sıcaklıkları 37 °C'de tutuldu.

3.2.2. İskemi/Rekanalizasyon Modelinin Oluşturulması

Bu model için intraluminal filament tekniği kullanıldı. Boynun orta kısmından yapılan insizyonla, ana (common) ve eksternal karotit arterler ortaya çıkarılıp sütür ile kalıcı olarak bağlandı. Ana karotit arter, orta kesiminde açılan bir kesikle internal karotit arter içine doğru giden bir filament yerleştirilerek, filamentin yuvarlak ucu orta serebral artere ulaşınca kadar itildi (Şekil 3.1) (101).

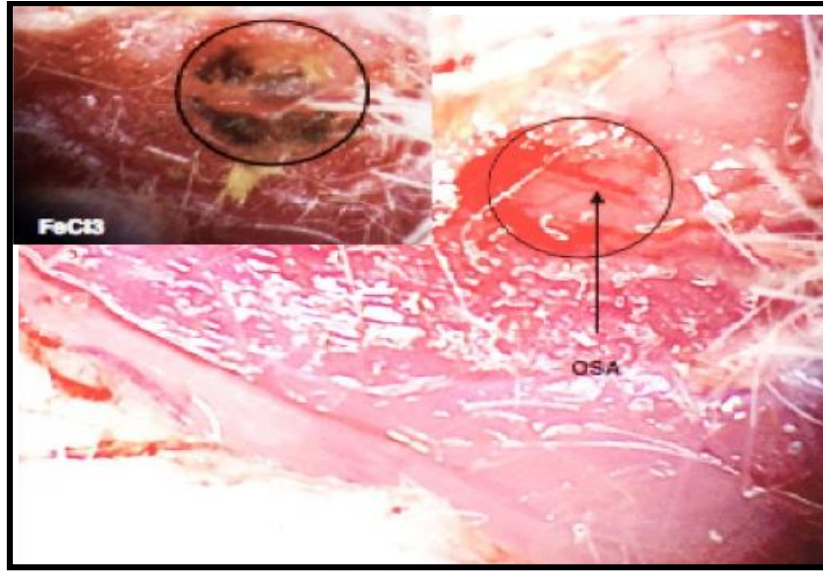


Şekil 3.1. İskemi/rekanalizasyon modelinin mikroskop görüntüsü.

Bütün farelerde aynı oranda iskemi oluşturulduğunu belirlemek için serebral kan akımı ölçüldü. Bu sebeple oklüzyondan sonra ve oklüzyon sırasında bölgesel serebral kan akımındaki değişimler belirlenip, iskemik koşulların oluşturulması için serebral kan akışının % 30'un altına düşmesi beklendi (n=2). Bunun için kafatasına esnek bir prob yerleştirilerek (bregmanın 2 mm posterior 6 mm lateraline) lazer Doppler akım ölçer cihazı ile kan akış hızı takip edildi. Farelere oklüzyondan 60 dakika sonra tekrar anestezi uygulanıp, filament çıkarıldı. Rekanalizasyon süreci (6, 24, 72 saat) sonunda fareler yüksek doz kloralhidrat anestezisi altında kurban edildi.

3.2.3. FeCl₃ İle Kalıcı İskemi Modelinin Oluşturulması

Fareler stereotaksi çemberine yerleştirildikten sonra kafa derisi açılıp, çevre dokulara zarar vermeden sağ temporal kas disekte edildi. Kafatası yüksek hızlı drill ile inceltirilip, OSA görünür hale gelince inceltilmiş olan kemik, forseps yardımıyla çıkarıldı. Bölgesel serebral kan akımı OSA sulama alanı olan inceltilmiş parietal kemik bölgesinden lazer speckle görüntüleme tekniği ile kaydedildi. İskemi öncesi kan akımı stabil hale geldikten sonra, bir parça filtre kağıdına emdirilmiş olan % 30'luk FeCl₃ dumanının intact kalmasına dikkat edilerek, OSA boyunca yerleştirildi. Serebral kan akımı düşüşü görüldükten sonra (3-5 dakika) filtre kağıdı kaldırıldı (102) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kalıcı iskemi modelinin mikroskop görüntüsü.

3.2.4. Nörolojik Muayene Değerlendirmesi

Bazal ve cerrahi girişim sonrası nörolojik muayene için aşağıdaki puanlama sistemi kullanıldı (103). Buna göre;

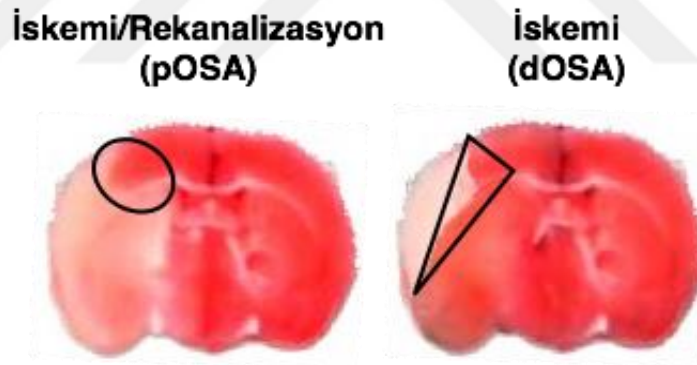
- 0: Görünür nörolojik hasar yok (normal)
- 1: Sağ pençeyi uzatmada yetersizlik (hafif)
- 2: Karşı tarafa dönme (orta)
- 3: Yürüme ya da doğrulma refleksinde kayıp (ağır).

3.2.5. 12/15 LOX İnhibitörünün Uygulanması

Massachusetts General Hospital, Neuroprotection Research Laboratory’de çalışan Doç. Dr. Klaus van Leyen’den 12/15 LOX inhibitörü temin edilmiştir. İnhibitör DMSO içinde çözünmüştür. Hem inhibitör bileşik hem de çözücüsü intraperitoneal yolla iskemiden 1 saat sonra 50 mg/kg dozda enjekte edilmiştir. Bu zamanlama ve uygulanan doz, van Leyen ve arkadaşlarının yaptığı daha önceki çalışmalara dayanarak seçilmiştir (15).

3.2.6. İmmünohistokimyasal Yöntemle Protein İşaretleme

İmmünohistokimya yapılacak olan deney grupları heparinli serum fizyolojik ve % 4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edilerek beyinleri çıkarılacak ardından % 4 PFA solüsyonu içine alınıp +4 °C’ de 1 gece fikse edildi. Kriyoproteksiyon sağlamak için PBS tampon içinde hazırlanmış olan % 30’luk sukroz çözeltisine alınıp +4 °C’ de 1 gece inkübe edildi. Daha sonra beyin dokularından 12 mikrometrelik koronal kesitler alındı. Ardından Iba-1 (mikroglia belirteci), TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-10, MMP-9, TIMP-1, NLRP-1 ve NLRP-3’e karşı geliştirilmiş primer ve sekonder antikorlar ile immünofloresan işaretleme yapıldı. Dokular Nikon E-600 epifloresan mikroskop altında uygun filtreler kullanılarak 40X büyütme ile görüntülendi. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan beyin dokularında görüntü alınan bölgeler Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Her gruptan iki fare beyinde 6 doku kesiti incelenmiştir.



Şekil 3.3. İskemi ve iskemi/rekanalizasyon modelleri uygulanan fare beyin kesitlerinde epifloresan veya konfokal lazer taramalı mikroskop ile görüntülenen perienfarkt alan. İmmünohistokimyasal incelemeler enfarkt-perienfarkt sınırından yapılmıştır. 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorid (TTC) boyası almayan beyaz alanlar enfarktli doku bölgesini temsil etmektedir (104).

3.2.7. Biyokimyasal Analizler İçin Örnek Hazırlanışı:

Model oluşturulduktan sonra fareler yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilip, beyin dokuları çıkarıldı. Enfarktli beyin bölgesi (Şekil 3.4) çıkarıldıktan sonra

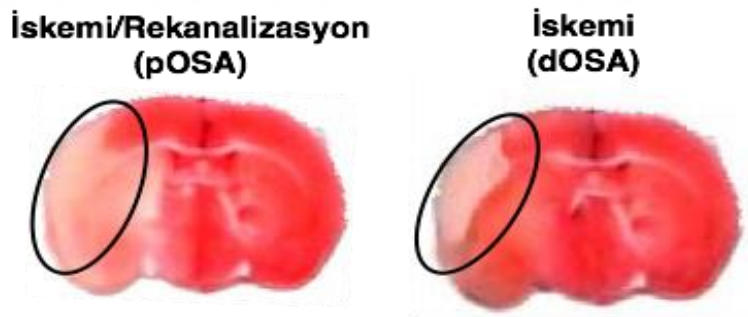
dokular tartıldı. Doku homojenizasyonu için yapılacak biyokimyasal analizlere uygun tampon hazırlandı. Tampon içeriği;

25 mM Tris tamponu (pH 7.4)

- 2 mM EDTA
- 5 mM MgCl₂
- % 0.1 Triton X-100

Yapılacak analizler ve kullanılacak örnek miktarı gözönünde bulundurularak % 10 (w/v) homojenat hazırlanmasına karar verildi. Dokuların üzerine tampon ve proteaz inhibitörü (1X) eklendikten sonra 3 x 10 saniye bıçaklı homojenizatör ile homojenize edildi. Tüm bu işlemler protein yıkımını önlemek için buz üzerinde yapıldı.

MDA analizinde kullanılmak üzere homojenatlardan 100'ler ul örnek ayrılıp, -80 °C dondurucuda saklandı. Geriye kalan homojenatlar +4 °C' sıcaklıkta 13.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı (süpernatant) peletten ayrılıp, ELISA ve jelatin zımografi için kullanıldı.



Şekil 3.4. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere homojenize edilen beyin bölgesi (104).

3.2.8. Lipit peroksidasyonu /Malondealdehit (MDA) ölçümü

Lipit peroksidasyonu (MDA) ölçümünde TBARS Assay Kiti (OxiSelect TBARS Assay Kit, CellBiolabs) kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi MDA'nın Tiyobarbitürik asit (TBA) ile 1:2 konjugat oluşturmaya dayanır. Öncelikle örnekler % 5 bütül hidroksitolüen ile seyreltildi ve ardından 100 µl örneğe 100 µL SDS lizis

çözültisi eklenerek mikrofüj tüplerine alındı. Tüpler karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, örneklere 250 µl TBA eklendi. Daha sonra tüpler 95 °C’de 45 dakika inkübe edildi. Ardından tüpler buz üzerinde 5 dakika soğutulup, 10.000 x g’de 15 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonrasında üst sıvıdan 200 µl alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 300 µl bütanol eklendi. Karışım 3 dakika 3000 rpm’de vortekslenip ardından 10.000 x g’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikroparka okuyucusunda 532 nm dalga boyunda okutuldu. Sonuçların hesaplanması için standart grafik eğrisinden yararlanıldı. Sonuçlar ölçülen MDA miktarlarının yaş doku ağırlığına oranlanması ile standardize edilmiştir.

3.2.9. ELISA ile Sitokinlerin Kantitatif Analizi

TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, TGF-beta ve IL-10 ölçümü için ELISA kiti kullanıldı. Tablo 3.3.’de kitlerin kullanım amacı ve üretici firmalar birlikte verilmiştir.

Tablo 3.3. Biyokimyasal analizler için kullanılan ELISA kitleri.

Kitler	Kullanım Amacı	Üretici Firma
TNF-alfa ELISA kiti, fare	TNF-alfa miktar tayini	BioLegend
IL-6 ELISA kiti, fare	IL-6 miktar tayini	BioLegend
TGF-beta ELISA kiti, fare	TGF-beta miktar tayini	BioLegend
IL-10 ELISA kiti, fare	IL-10 miktar tayini	BioLegend
IL-1beta ELISA kiti, fare	IL-1beta miktar tayini	Thermofisher

Bu kitlerin özelliği mikroparkalara ilgili proteine ait monoklonal primer antikor yapıştırılmış olarak bulunmalarıdır. Bu şekilde örnek ve standartlarda var olan ilgili protein, primer antikor tarafından tanınır ve tutulur. Daha sonra bağlı örnekleri tanıyan biyotinlenmiş bir poliklonal sekonder antikor, tutunmuş olan proteini tanır. Sandviç sisteminin en son bileşeni olan streptavidin-peroksidaz konjugatı ise biyotinli antikorunu tanıyarak ortama eklenen kromojen substrat yardımı ile çok düşük miktarlarda bile var olan protein miktarının saptanmasını sağlar. Elde

edilen ölçüm sonuçları toplam protein miktarına oranlanarak standardize edilmiştir (ng/mg protein).

3.2.10. Jetalin Zimografisi

MMP-9 ve inhibitörü olan TIMP-1 proteinleri sırasıyla jelatin zimografisi ve ters jelatin zimografisi tekniği ile belirlenecektir. Zimografisi proteolitik aktivitenin incelenmesinde kullanılan elektroforetik bir yöntemdir. Bu teknik, SDS-PAGE jel içine ilgili MMP enziminin substratı eklenerek örnek içindeki enzimin bu substratı tüketmesi esasına dayanır. Jelatin zimografisi yönteminde jelatinaz enzim grubunun substratı olan jelatin, yürütücü jeli oluşturan akrilamid ile kopolimerize olur. MMP-9 (92 kDa) indirgen-olmayan koşullar altında elektrik alanında moleküler ağırlıklarına göre uygun bölgeye göç ederler (105,106).

Yönteme geçilmeden önce stok ayrıştırıcı jel tamponu (1,88 M Tris-bazı pH 8.8), sıkıştırıcı jel tamponu (1,25 M Tris-HCl pH 6.8), % 20'lik SDS çözeltisi, yürütme tamponu (0,25 M Tris- 1,92 M glisin pH 8.3), örnek yükleme tamponu (0,25 M Tris-HCl, % 40 Gliserol, % 8 stok SDS, % 0,2 Bromfenol mavisi), renatüre edici çözelti (% 2,5 Triton X-100) ve developer tamponları (0,5 M Tris-bazı, 2 M NaCl, 0,05 M CaCl₂, % 0,2 Brij 35 pH 7.8) hazırlandı. Zimografisi jelleri elektroforez tankına yerleştirildikten sonra protein miktarları belirlenmiş olan örnekler kuyulara yerleştirildi. Yürütme işlemi 125 V sabit voltajda 1.5-2 saat yürütüldü. Elektroforezden sonra jellerden SDS'i uzaklaştırmak için jeller 30 dakika 10 kat seyreltilmiş olan % 2,5'luk Triton X-100 renatürasyon tamponu ile inkübe edilip, MMP-9'un (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratı ile tepkimeye girebilmesi için aktivasyon tamponunda 15 saat inkübe edildi. Proteinlerin görünür hale gelmesi için jeller boya çözeltisi (% 5 metanol, % 10 asetik asit, % 0,5 Coomassie Brilliant Blue R-250) ile boyandı. Zemindeki boyanın fazlasını gidermek için jeller % 5 metanol ve % 10 asetik asit solüsyonunda bekletildi.

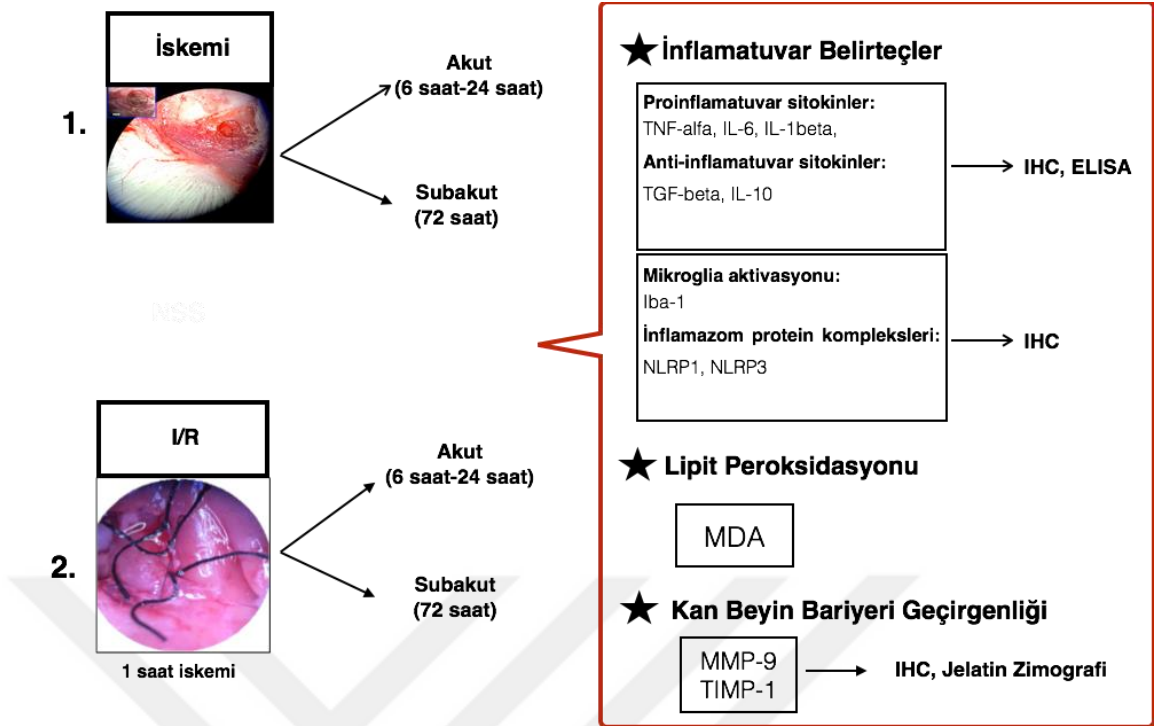
VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bulgular ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. Biyokimyasal analizlerin istatistiksel değerlendirmesi için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Nörolojik muayene skorlaması için gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. ELISA ve MDA ölçüm sonuçları Tukey çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. Zaman noktaları arasında gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

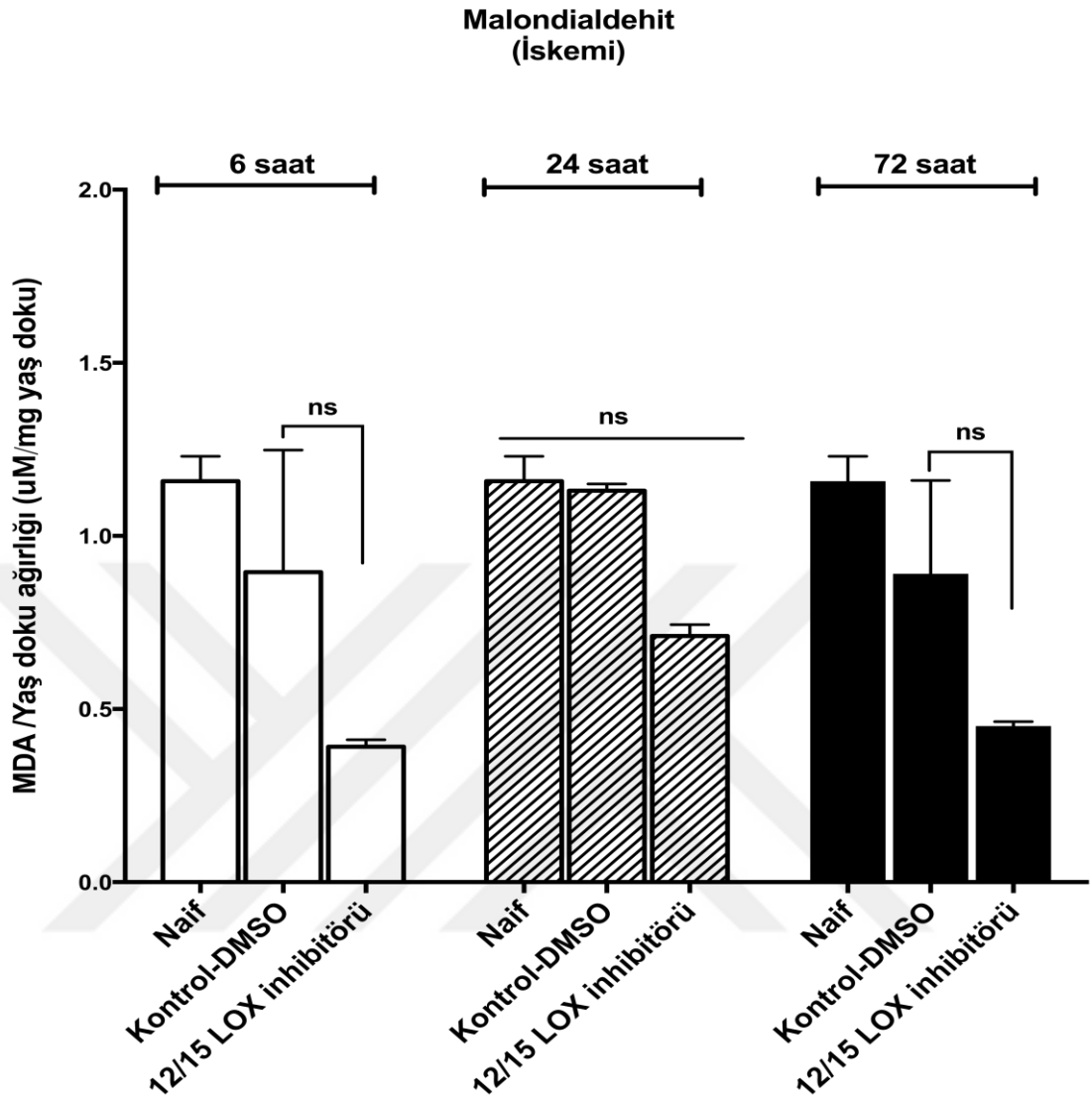
Bu çalışmada %30 FeCl₃ emdirilmiş filtre kağıdının orta serebral arter (OSA) üzerine en az 3 dakika uygulanması ile kalıcı iskemi yapılan ve OSA'ya ip itilerek iskemi ve 1 saat sonra rekanalizasyon yapılan iki farklı serebral iskemi modeli oluşturulmuştur. Serebral iskeminin indüklediği inflamasyon ve sistemik yolla uygulanan 12/15 LOX inhibitörünün bu inflamasyon üzerine olan etkisi 3 farklı zaman noktasında (6, 24 ve 72 saat) ve farklı teknikler kullanılarak incelenmiştir. Öncelikle her iki modelde de lipid peroksidasyonunu değerlendirmek üzere MDA seviyeleri yaş dokuda spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Daha sonra serebral iskemi sonrası ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonun önemli bir belirteci olan mikrogliya aktivasyonu immünohistokimyasal yolla Iba-1 antikoru ile işaretlenerek değerlendirilmiştir. Serebral iskemi sonrası inflamatuvar reaksiyonun olduğu saptandıktan sonra, inflamazom kompleksinin aktive olup olmadığı NLRP1 ve NLRP3 proteinleri ile immünohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. Ardından hem pro-inflamatuvar (IL-1beta, IL-6 ve TNF-alfa) hem de anti-inflamatuvar (TGF-beta ve IL-10) belirteçler her iki modelden elde edilen örneklerde her üç zaman noktasında hem immünohistokimyasal yöntemlerle hem de ELISA yöntemi ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Son olarak her iki modelde de iskemi sonrası kan beyin bariyeri geçirgenliğini değerlendirmek üzere MMP-9 ve inhibitörü olan TIMP-1 immünohistokimyasal yöntem ve jelatin zimografi yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Deney tasarımı ve analiz yöntemlerinin şematik gösterimi.

4.1. Lipid Peroksidasyonunun Malondialdehit Ölçümü İle Belirlenmesi

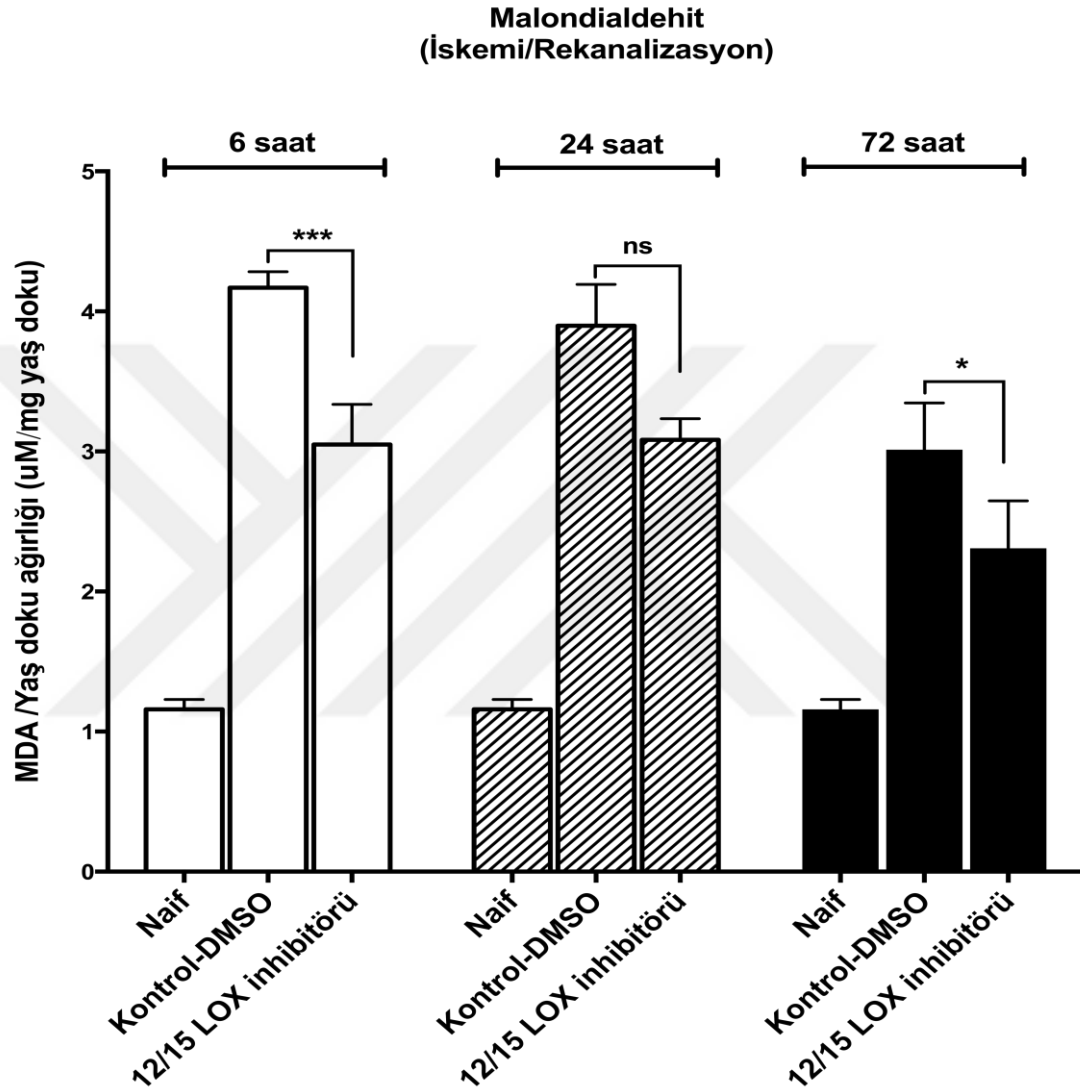
İskemi ve iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında lipit peroksidasyonu TBARS yöntemi esas alınarak belirlenmiştir. Sonuçların standardizasyonu için elde edilen MDA ölçümleri, homojenize edilen yaş doku ağırlığına oranlanmıştır. İskeminin zaman farklı noktalarında elde edilen ölçümler aynı grafik üzerinde verilerek zamansal farklılıkları değerlendirilmiştir. Buna göre iskemi modelinde 6, 24 ve 72 saatler arasında lipit peroksidasyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Her bir grup kendi içinde analiz edildiğinde tedavi ile MDA ölçümünün kontrole göre azaldığı ancak farkın anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İskemi modelinde 6, 24 ve 72. saatlerde beyin doku homojenatlarında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen malondialdehit miktarlarının (μM), yaş doku ağırlığına (mg) oranlanarak lipid peroksidasyonunun belirlenmesi. Zamansal açıdan 6, 24 ve 72 saatleri arasında ve her bir zaman noktasının naif, kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$; $n=3/\text{grup}$).

İskemi/rekanalizasyon modelinde ölçülen lipid peroksidasyonu, 6, 24 ve 72. saat tedavi grupları arasında farklılık göstermezken, 6. ve 72. saat kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p = 0,0135$; $n=3/\text{grup}$). Her grup kendi içinde analiz edilmiştir. Buna göre 6 saat iskemi/rekanalizasyon modelinde lipid peroksidasyonu tedavi grubunda kontrole göre azalmıştır. 24 saat iskemi/rekanalizasyon modelinde lipid peroksidasyonu 12/15 LOX inhibitörü verilen

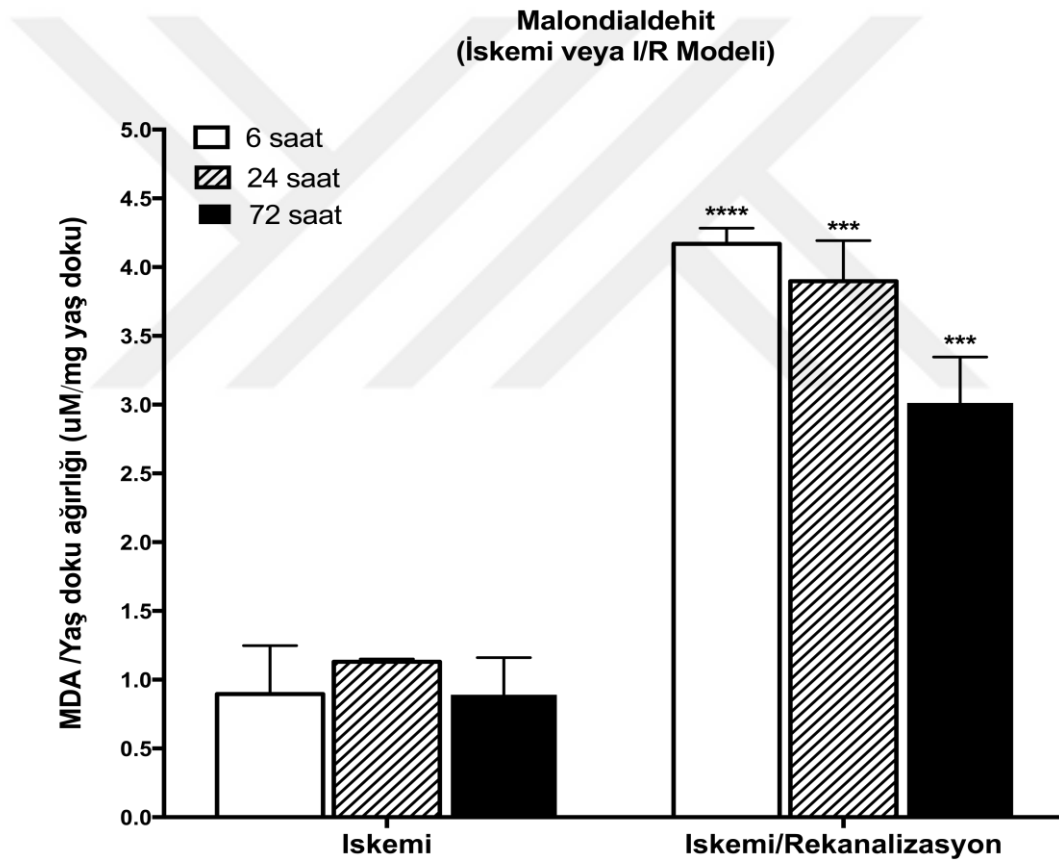
tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma eğilimi göstermiştir. 72 saat iskemi/rekanalizasyon modelinde ise lipit peroksidasyonunun tedavi grubunda kontrole göre anlamlı oranda azaldığı görülmüştür ($p=0,049$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İskemi/rekanalizasyon modelinde 6, 24 ve 72. saatlerde beyin doku homojenatlarında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen malondialdehit miktarlarının (uM), yaş doku ağırlığına (mg) oranlanarak lipit peroksidasyonunun belirlenmesi. Lipit peroksidasyonu 6 ve 72. saatlerde kontrole göre tedavi grubunda azalmıştır (** $p=0,0006$; $n=3/\text{grup}$, * $p=0,049$; $n=3/\text{grup}$).

Elde edilen verilere göre lipit peroksidasyonunun şiddeti iskemi ve iskemi/rekanalizasyon modelleri arasında farklılık göstermektedir. Şekil 4.4’de iki modelin kontrol grupları arasındaki lipit peroksidasyon oranı grafik üzerinde

özetlenmiştir. Buna göre iskemi/rekanalizasyon modelinde lipit peroksidasyonu iskemi modeline göre anlamlı oranda artmıştır. Bunun en temel nedeni iskemi/rekanalizasyon modelinde rekanalizasyonun etkisi ile oluşan oksidatif hasarın, kalıcı iskemi modeline göre daha şiddetli olmasıdır. Bu bulgu bize oksidatif hasarın değerlendirilmesinde kalıcı iskemi modelinin uygun bir model olmadığını gösterebilir. Bir diğer neden kalıcı iskemi grubunda alınan dokunun hem enfarkt, hem de normal dokuyu içermesi nedeniyle oluşan oksidatif hasarın dilüe olması olabilir. Yine denek sayısının az olması da kalıcı iskemi modelinde MDA seviyelerinin tedavi ile azalmasının anlamlı olmamasını açıklayabilir.

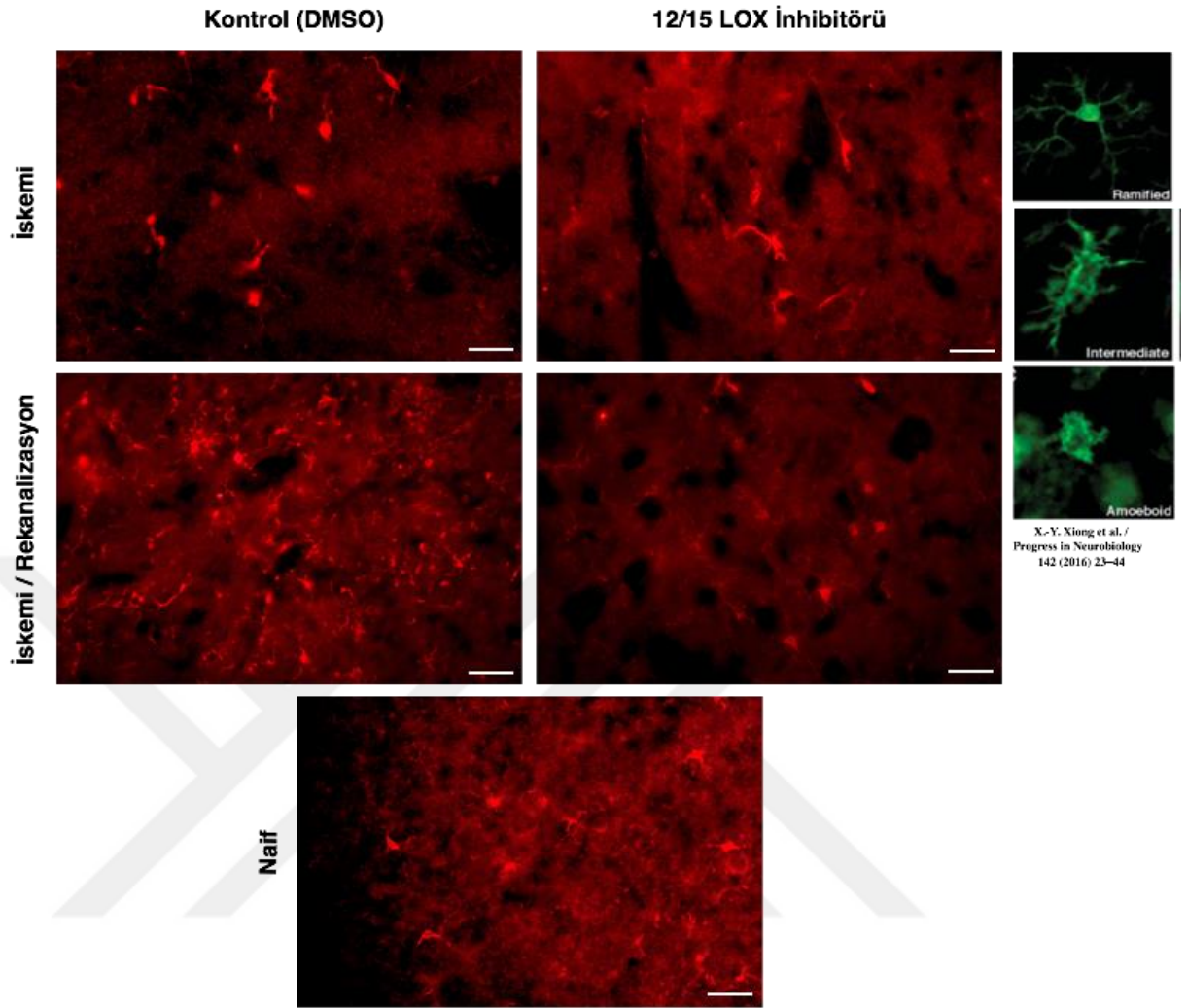


Şekil 4.4. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli kontrol (iskemiden 1 saat sonra DMSO verilen) gruplarının lipit peroksidasyonu yönünden karşılaştırılması. İskemi/rekanalizasyon modelinde lipit peroksidasyonu iskemi modeline göre anlamlı oranda artmıştır. Her iki modelde de lipit peroksidasyonu zamana bağlı değişim göstermemiştir (**** $p < 0,0001$; $n=3$ /grup, 6. saatte ölçülen malondialdehit miktarları iki model arasında farklıdır. *** $p=0,0003$; $n=3$ /grup, 24 ve 72. saatlerde ölçülen malondialdehit miktarları modeller arası farklılık göstermektedir).

4.2. Serebral İskemi Sonrası Ortaya Çıkan İnflamatuvar Yanıtın Mikrogliya Aktivasyonu Üzerinden Değerlendirilmesi

Bilindiği gibi inflamasyon, tehlike sinyallerine karşı dokunun kendini savunma mekanizmasıdır. Burada amaç hasarlı dokunun bütünlüğünü yeniden kazanması, hasarın sınırlandırılması ve ortadan kaldırılmasıdır. Beyinde bu rolü mikrogliya hücreleri üstlenmektedir. Mikroglialar merkezi sinir sisteminde tanımlanmış doku makrofajlarıdır. Uyarana bağlı olarak mikrogliaların morfolojisi değişiklik göstermektedir. Genellikle *ramified*, *intermediate*, *amoeboid* olmak üzere 3 farklı morfolojide bulunmaktadır (Şekil 4.5., yan sütün) (107). Dinlenme halinde morfolojileri *ramified* olarak karakterize edilmiştir. *Intermediate* ve *amoeboid* ise mikrogliaların çevreden aldığı tehlike sinyallerine verdiği yanıt sonucu yapısında meydana gelen değişiklikleri yansıtmaktadır. *Ameoboid* form mikrogliaların özellikle hasarlı doku bölgesine göç ederken aldığı şekli yansıtmaktadır (107).

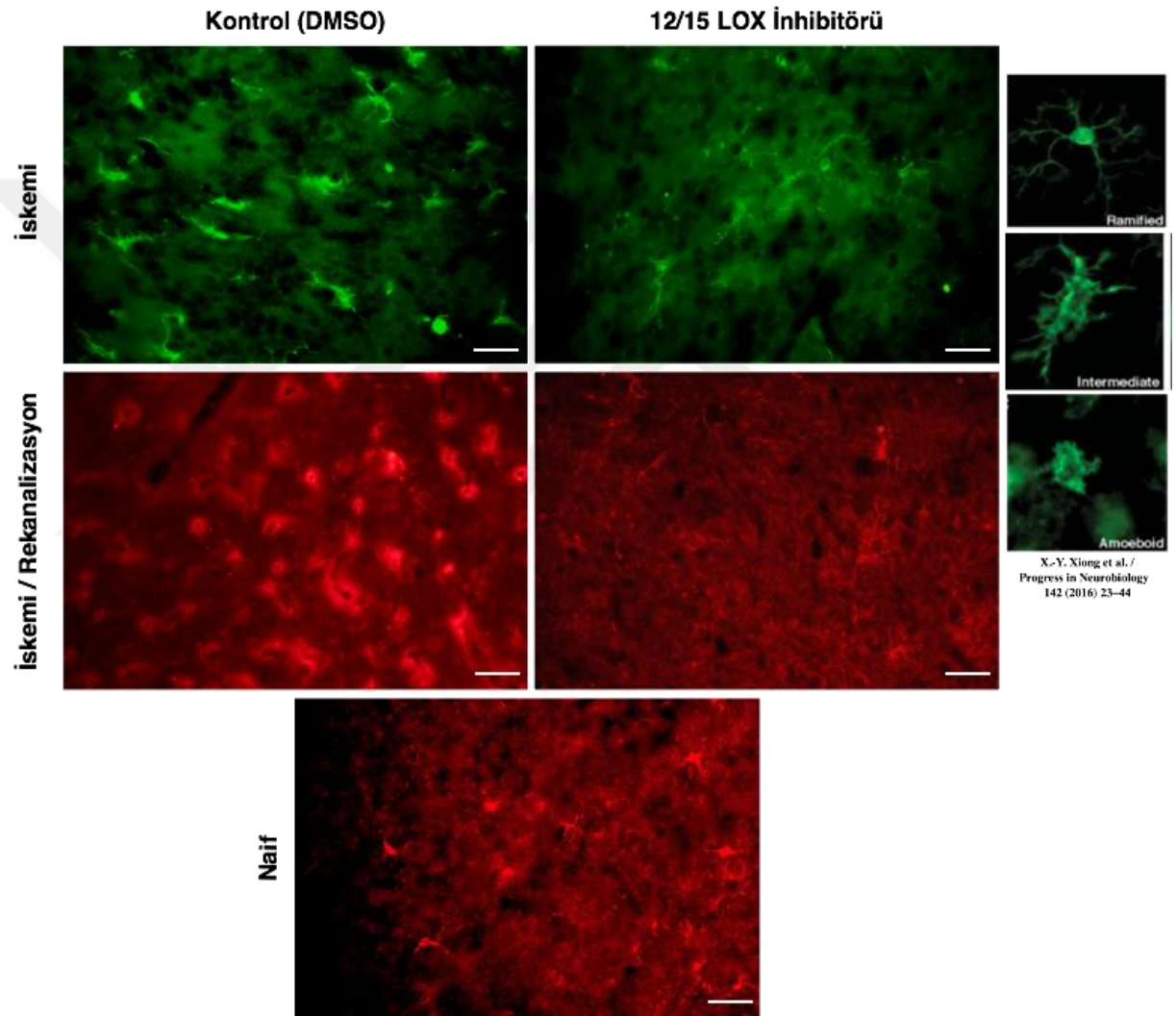
Çalışmamızda kalıcı iskemiden 6 saat sonra kontrol grubunda mikrogliya aktivasyonu naif beyne göre artmış olmakla birlikte tedavi grubu ile arasında belirgin farklılık saptanmamıştır. Ancak iskemi/rekanalizasyon grubunda 6. saatte kontrol grubunda mikrogliya aktivasyonu çok belirgin olarak artmıştır. Bu grupta *intermediate* ve *amoeboid* morfolojinin baskın olduğu gözlenmektedir. Tedavi verilen grupta ise hem hasarlı bölgeye göç eden mikrogliya sayısı azalmış hem de mikroglialar normal morfolojik yapılarını (*ramified*) geri kazanmıştır (Şekil 4.5). Kalıcı iskemiye göre mikrogliaların hasara verdiği yanıt daha şiddetlidir. Bunun en temel nedeni, bu modelle oluşturulan hasarın daha geniş bir beyin alana yayılması ve rekanalizasyon ile oluşan hasarın şiddetli olmasıdır. Bu sonuca göre iskeminin erken döneminde kalıcı modelde mikrogliya aktivasyonu belirgin değildir.



Şekil 4.5. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikrogliyal hücre aktivasyonunun görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. Mikroglia belirteci olarak Iba-1 proteini işaretlenmiştir. Kalıcı iskemi grubundan bir örneğin yer aldığı üst panelde kontrol ve tedavi grubunda mikrogliya aktivasyonunun nisbeten başladığı görülmektedir. İ/R grubundan bir örneğin yer aldığı alt sol panelde ise kontrol grubu farede enfarkt ve peri-enfarkt alanda mikrogliyalarda ifade edilen Iba-1 immünohistokimyasal işaretlenmesinin yoğun olduğu ve mikrogliyal aktivasyon olduğu görülürken, alt sağ panelde tedavi grubu farede, enfarkt ve peri-enfarkt alanda mikrogliyal aktivasyonun belirgin olarak azaldığı izlenmektedir (40X büyütme, ölçek 20 μ m).

Kalıcı ve iskemi/rekanalizasyon gruplarında iskemiden 24 saat sonra kontrol grubunda mikrogliya aktivasyonunun naif beyne göre belirgin olarak artmış ancak tedavi grubunda bu aktivasyon baskılanmıştır (Şekil 4.6). Kalıcı iskemi modelinde

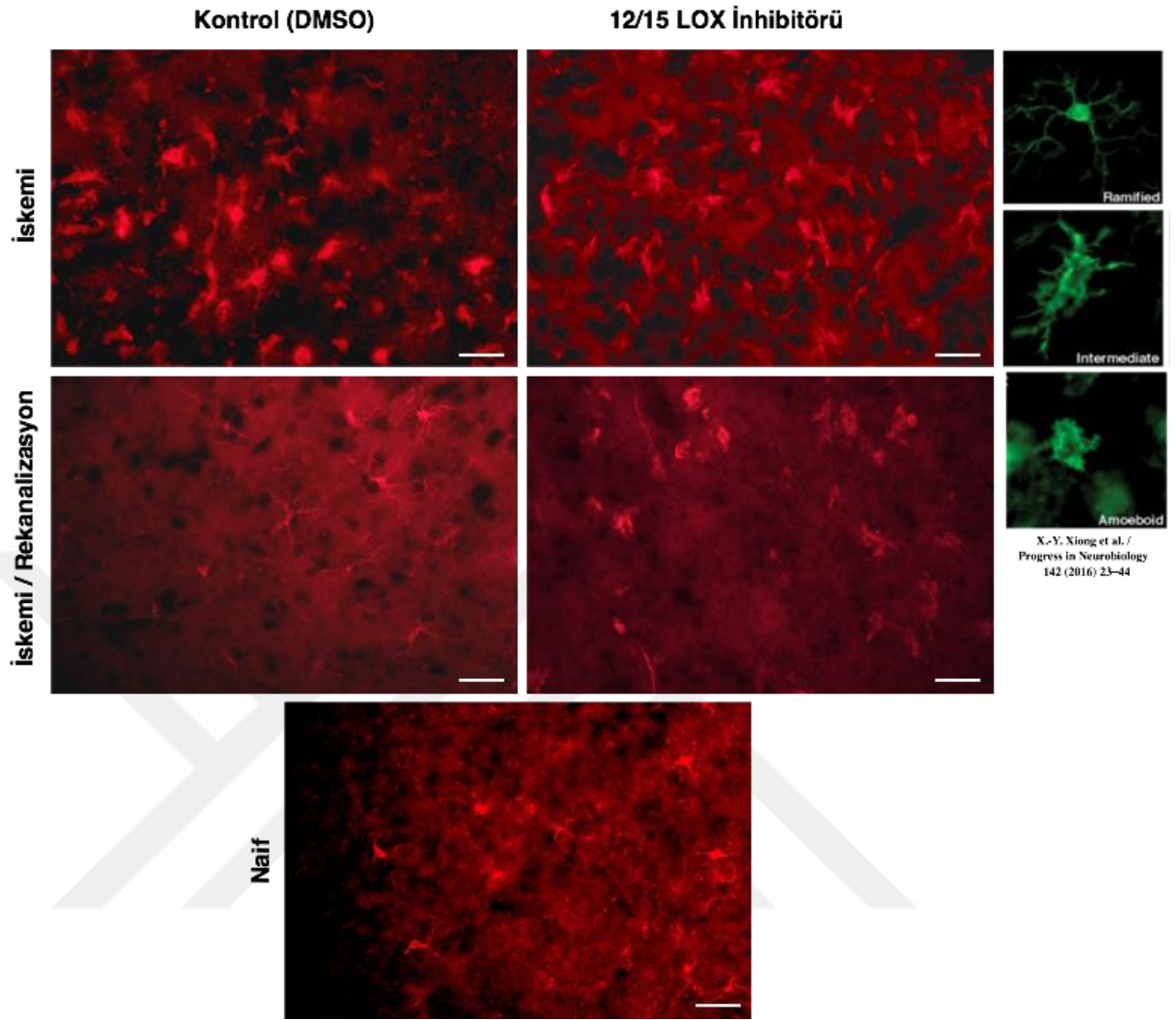
oluşan hasar daha hafif olduğu için ancak 24 saat sonra inflamatuvar reaksiyonu tetikleyebildiği düşünülmüştür. İskemi/rekanalizasyon modelinde ise erken dönemden itibaren inflamatuvar reaksiyon tetiklenmektedir. Bu bulgular her iki iskemi modelinde de 12/15 LOX inhibisyonunun, iskemiden 24 saat sonra inflamatuvar bileşenlerin üretiminden sorumlu olan mikroglia hücre aktivasyonunu baskıladığına işaret etmektedir.



Şekil 4.6. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikroglial hücre aktivasyonunun görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. Mikroglia belirteci olarak Iba-1 proteini işaretlenmiştir. Kalıcı iskemi ve İ/R deney gruplarında iskemiden 24 saat sonra kontrol grubunda mikroglia aktivasyonu naif beyne göre belirgin olarak artmış, ancak tedavi gruplarında bu aktivasyon baskılanmıştır (40X büyütme, ölçek 20 µm).

Mikroglia aktivasyonunun en belirgin olarak kalıcı iskemiden 72 saat sonra arttığı saptanmıştır ve 12/15 LOX inhibitörü ile bu aktivasyon sınırlandırılmaktadır. İlginç olarak iskemi/rekanalizasyon grubunda 72 saatte inflamatuvar reaksiyon hem kontrol hem de tedavi grubunda neredeyse naif beyin seviyesine gerilemiştir (Şekil 4.7). Buna göre kalıcı iskemi modelinde inflamasyonun daha geç dönemde aktive olduğu ve daha uzun sürdüğü öne sürülebilir. Bu bilgiden yola çıkarak inme tedavisinde kullanılması planlanan anti-inflamatuvar tedavilerin ve lipoksijenaz inhibitörlerinin tedavi penceresi, hastanın inme tipine göre düzenlenebilir.





Şekil 4.7. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında mikrogliyal hücre aktivasyonunun görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. Mikroglia belirteci olarak Iba-1 proteini işaretlenmiştir. Kalıcı iskemi örneğinin yer aldığı üst sol panelde mikroglia aktivasyonunun yoğun olduğu ve bunun tedavi ile baskılandığı görülmektedir. İ/R grubunda ise mikroglia aktivasyonu hem kontrol hem de tedavi grubunda neredeyse naif beyin seviyesine gerilemiştir (40X büyütme, ölçek 20 µm).

4.3. Serebral İskemi Sonrası Ortaya Çıkan İnflamatuvar Yanıtta İnflamazom Protein Komplekslerinin Rolü

Serebral iskemide nöron ve glial hücre ölümüne neden olan inflamasyon sürecine, inflamazom adı verilen çoklu protein kompleksleri de aracılık etmektedir. İnflamazomlar sitozolik çoklu protein kompleksleridir ve doku hasarını algılayan

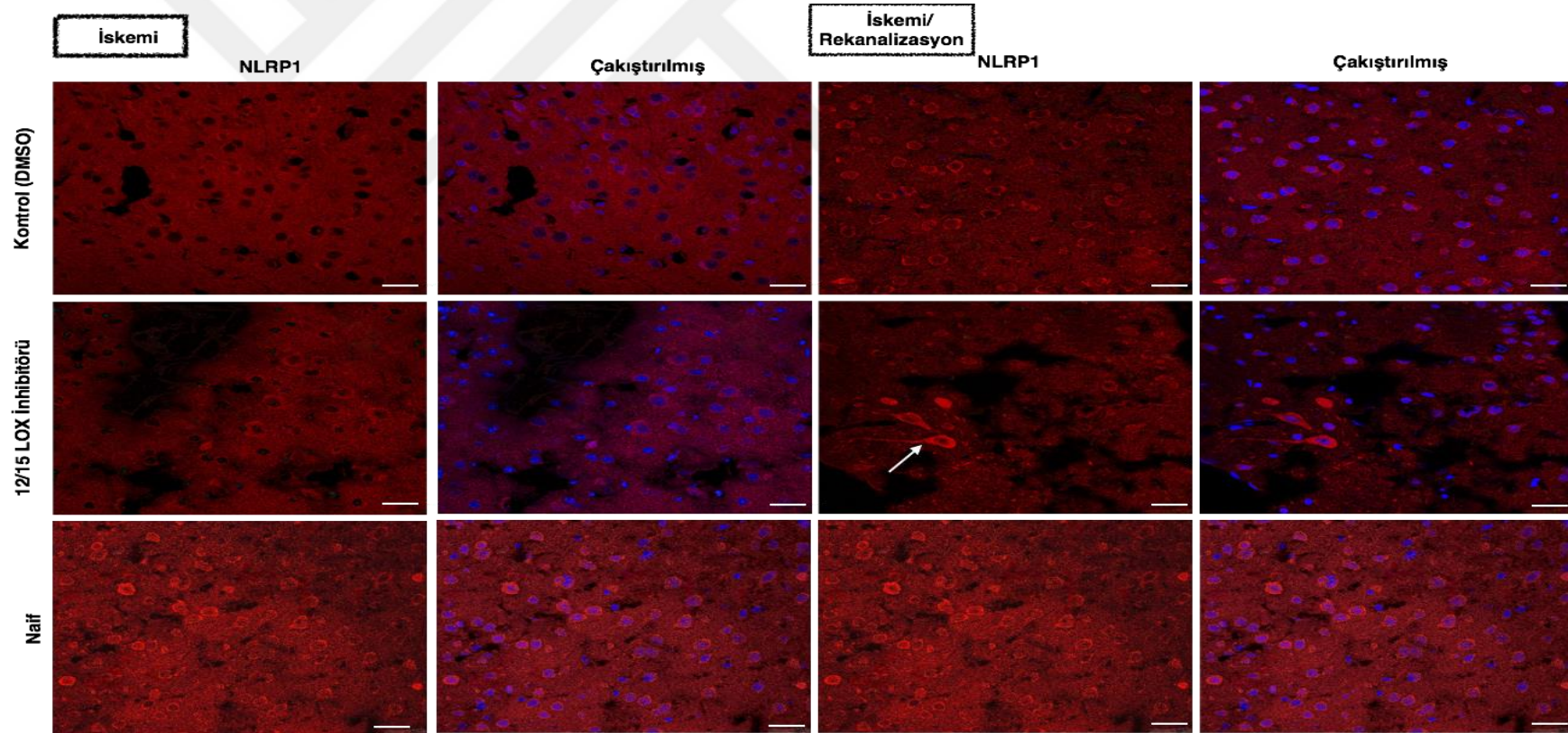
sensörler gibi davranmaktadırlar. Uyarı geldiğinde, normal fizyolojik koşullarda çekirdekte bulunan ASC proteini sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada oligomerize olarak, NLRP1 ve pro-kaspaz1 arasında köprü görevi görüp kompleksi bir araya getirir. İnflamazom komplekslerinden NLRP1 daha çok nöronda, NLRP3 ise daha çok glial hücrelerde ve özellikle mikroglia'da ifade edilmektedir. İnflamazom aktivasyonunun hücrede proinflatuvar sitokin (IL-1beta, IL-6) veya alarmin (HMGB1) grubu proteinlerin aktifleşmesine ve hücre dışına salınımına neden olduğu bilinmektedir.

4.3.1. NLRP1 İnflamazom Protein Kompleksinin İncelenmesi

Şekil 4.8'de naif dokuda NLRP1 işaretlenmesinin hem nükleer hem de sitoplazmada olduğu görülmektedir. Bunun nedeni antikorun NLRP1 inflamazom kompleksinin ASC epitopunu da tanınması olabilir. Bu çalışmada 6 saat iskemi sonrası hem kontrol (DMSO) hem de tedavi (ML351) grubunda NLRP1 sinyalinin sitoplazmaya lokalize olduğu izlenmektedir (Şekil 4.8). 6 saat iskeminin ardından hücrelerin çekirdeğinde işaretlenmenin olmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin ASC alt biriminin sitoplazmaya geçmesi ile işaretlenmenin sadece sitoplazmaya sınırlanması olduğu düşünülmüştür. İskemi/rekanalizasyon grubunda ise NLRP1 sinyalinin naif beyne göre kontrol (DMSO) grubunda önemli oranda azaldığı ve birkaç hücrede hem sitoplazmik hem de çekirdekte olduğu (çekirdekte ASC yoğunluğunun artmasına bağlı olarak), tedavi grubunda ise hemen hiç sinyal olmadığı görülmektedir (Şekil 4.8). Bunun NLRP1 protein kompleksinin aktifleşip tamamen kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

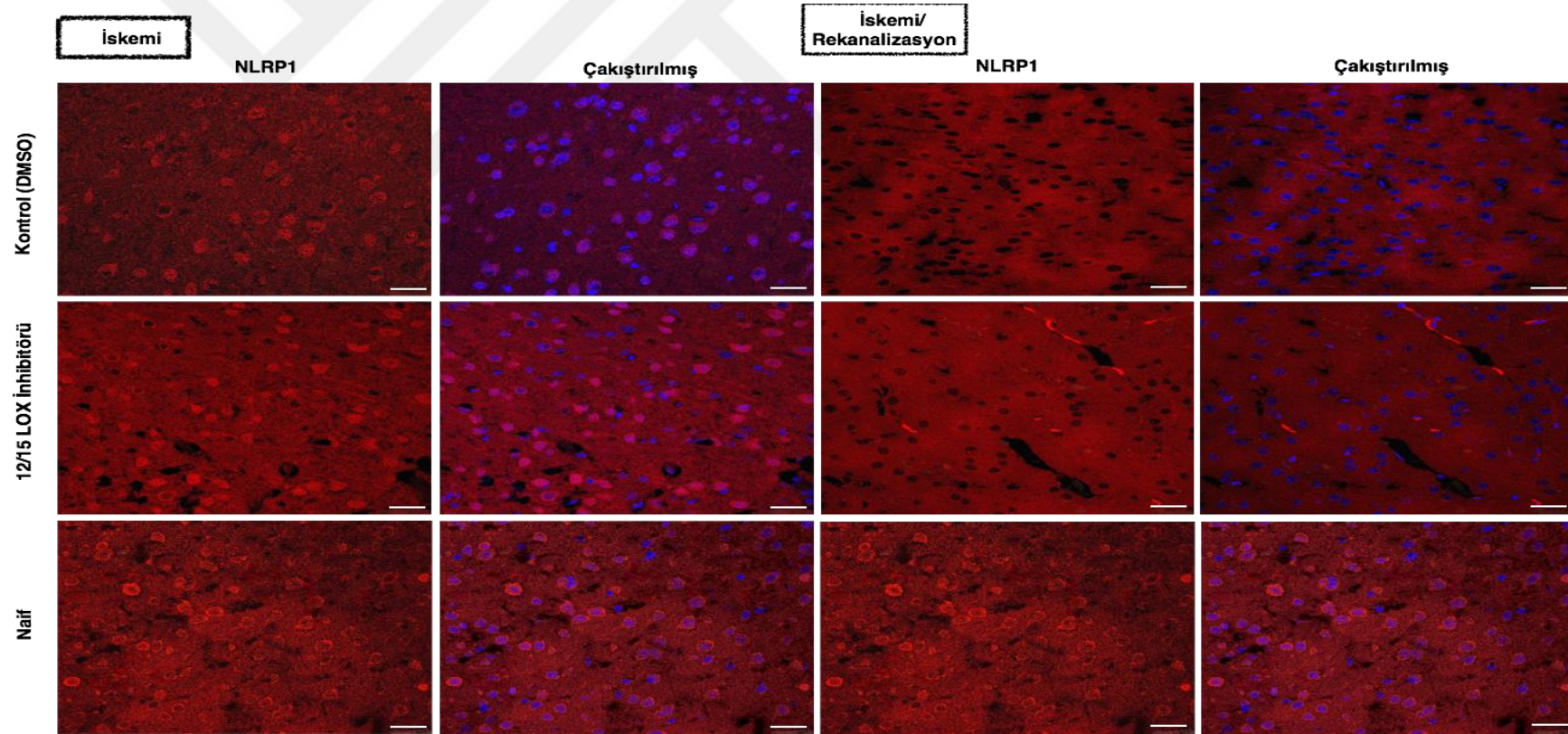
İskemiden 24 saat sonra sakrifiye edilen beyinlerden DMSO verilen fare beyin kesitinde NLRP1 sinyalinin olmadığı, tedavi grubunda ise NLRP1 immünoaktivitesinin sitoplazmaya lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). İnflamazom kompleksinin bir parçası olan ASC sitoplazmaya geçtiğinden dolayı çekirdekte işaretlenme görülmemektedir. İskemi/rekanalizasyon grubunda ip DMSO verilen fare beyin kesitinde NLRP1 immünoaktivitesinin sitoplazmaya lokalize olduğu, tedavi grubunda ise bu aktivitenin baskılandığı izlenmektedir. İ/R tedavi grubuna ait resimde NLRP1'in nöronal olduğunu gösterecek şekilde hem soma hem de aksonal uzantısında ifade edildiği görülmektedir (ok) (Şekil 4.9).





Şekil 4.9. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP1 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. İkinci ve dördüncü sütunda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile NLRP1 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). İskemi modeli oluşturulmuş kontrol grubu farelerin beyin dokusunda NLRP1 sinyalinin olmadığı, tedavi grubunda ise sitoplazmada lokalize olduğu görülmektedir. İskemi/rekanalizasyon grubunda ise DMSO verilen fare beyinde NLRP1 immünoreaktivitesinin sitoplazmaya lokalize olup, tedavi grubunda baskılandığı izlenmektedir. İ/R tedavi grubuna ait resimde NLRP1'in nöronal olduğunu gösterecek şekilde hem soma hem de aksonal uzantısında ifade edildiği görülmektedir (ok).

İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen beyinlerden DMSO verilen farelerin beyin kesitinde NLRP1 sinyalinin sitoplazmaya lokalize olduğu ve 24 saat kesitinde gözlenene göre arttığı görülmektedir. Tedavi grubunda ise NLRP1 immünoaktivitesinin hem nükleus hem de sitoplazmada arttığı izlenmektedir (Şekil 4.10). Bu da bize NLRP1 inflamazom kompleksinin tekrar sentezlenmiş olabileceğini göstermektedir. İskemi/rekanalizasyon grubunda ip DMSO verilen fare beyin kesitinde NLRP1 immünoaktivitesinin çok çok azaldığı, kalanların sitoplazmaya lokalize olduğu ve tedavi grubunda ise bu aktivitenin tamamen baskılandığı izlenmektedir (Şekil 4.10). Bu bulgular iskemi ve İ/R gruplarının model bazında iskemi sonrası ortaya çıkan NLRP1 aktivitesi açısından farklı davrandığını ve akut (6 ve 24 saat) ile subakut (72 saat) dönemler arasında da farklı bir immünoaktivite gösterdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.10. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP1 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. İkinci ve dördüncü sütunda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile NLRP1 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). İskemi grubunda DMSO verilen fare beyininde NLRP1 sinyalinin sitoplazmaya lokalize olduğu, tedavi grubunda ise NLRP1 immünoreaktivitesinin hem nükleus hem de sitoplazmada arttığı izlenmektedir. İskemi/rekanalizasyon grubunda DMSO verilen fare beyin kesitinde NLRP1 immünoreaktivitesi sitoplazmip olup, naif gruba göre azalmıştır. Tedavi grubunda ise bu aktivitenin tamamen baskılandığı görülmektedir.

Tablo 4.1. NLRP1 inflamazom kompleksinin immüno Floresan analiz sonuçları.

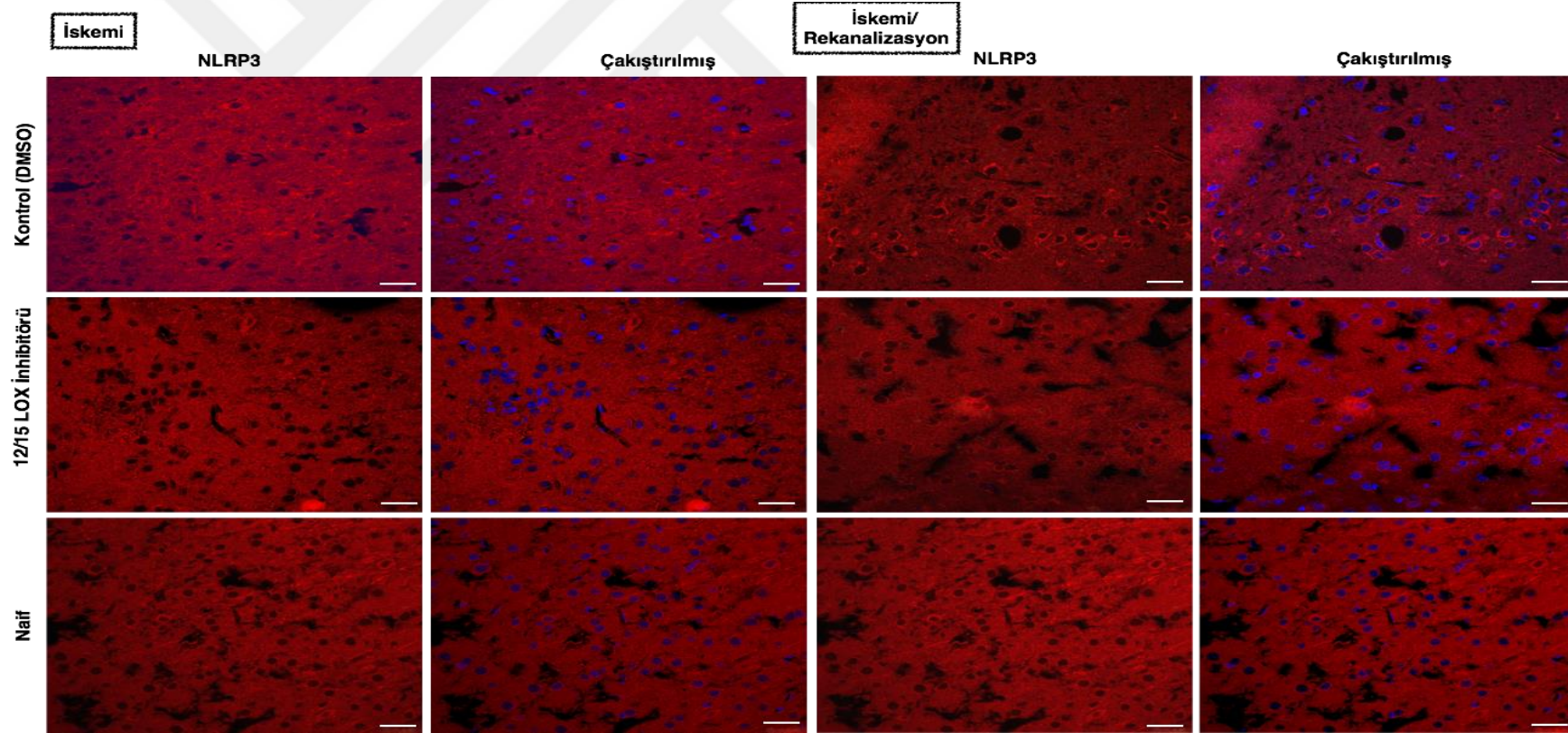
Uygulama /tür	İskemi			İskemi/ Rekanalizasyon			Naif
	6 saat	24 saat	72 saat	6 saat	24 saat	72 saat	
Kontrol (DMSO)	Sitoplazmik	Sinyal bulunmamaktadır.	Sitoplazmik	NLRP1 ifade eden hücrelerde sentezin artışına bağlı olarak sinyal yoğunluğu artmıştır. Bir taraftan sentez diğer taraftan kullanım artmıştır.	Sitoplazmik NLRP1 ifade eden hücre sayısı artmıştır.	Sitoplazmik	Sitoplazmik & nükleer
12/15 LOX İnhibitörü (ML351)	Sitoplazmik NLRP1 ifadesi kontrole göre baskılanmış olmakla beraber aralarında belirgin bir fark yoktur.	Sitoplazmik	Sitoplazmik & nükleer	12/15 LOX ile NLRP1 lokasyonu değişerek, dentritik uzantılarda ifade edilmiştir (Relocated)	Kontrole göre sitoplazmik NLRP1 ifade eden hücre sayısı azalmıştır.	Sinyal bulunmamaktadır.	

4.3.2. NLRP3 İnflamazom Protein Kompleksinin İncelenmesi

NLRP3 inflamazom kompleksleri mikrogliya ve astrositlerde ifade edilmektedir. Son zamanlarda literatürde özellikle mikrogliyal ifadesine vurgu yapılmaktadır (108). NLRP3'ün de tıpkı NLRP1'de olduğu gibi bir uyarı ile ASC ve prokaspaz-1 ile birleşerek inflamazom kompleksini oluşturduğu ve proinflamatuvar sitokinlerin aktifleşip salıverilmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada naif beyinden elde edilen kesitte NLRP3 immüno reaktivitesinin hücrelerin sitoplazmasına ve yer yer uzantılarına lokalize olduğu izlenmektedir. İskemiden 6 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda NLRP3 immüno reaktivitesinin hücrelerin (mikrogliya) uzantılarına lokalize olduğu ve genel olarak sinyalin arttığı tesbit edilmiştir. Tedavi grubunda bu tip bir sinyal izlenmemektedir. Az sayıda hücrenin sitoplazmasında NLRP3 işaretlenmesi mevcuttur ve sinyal azalmıştır. iskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 6 saat sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda sitoplazmik işaretlenme yoğundur. Tedavi grubunda ise şiddeti azalmış olmakla birlikte NLRP3 sitoplazmik işaretlenmesi izlenmektedir (Şekil 4.11). Bu bulgular hem iskemi hem de İ/R modelinde NLRP3

aktivitesinin kontrol gruplarında 6. saatte arttığını göstermektedir. 12/15 LOX inhibitörü ile bu artış baskılanmaktadır.

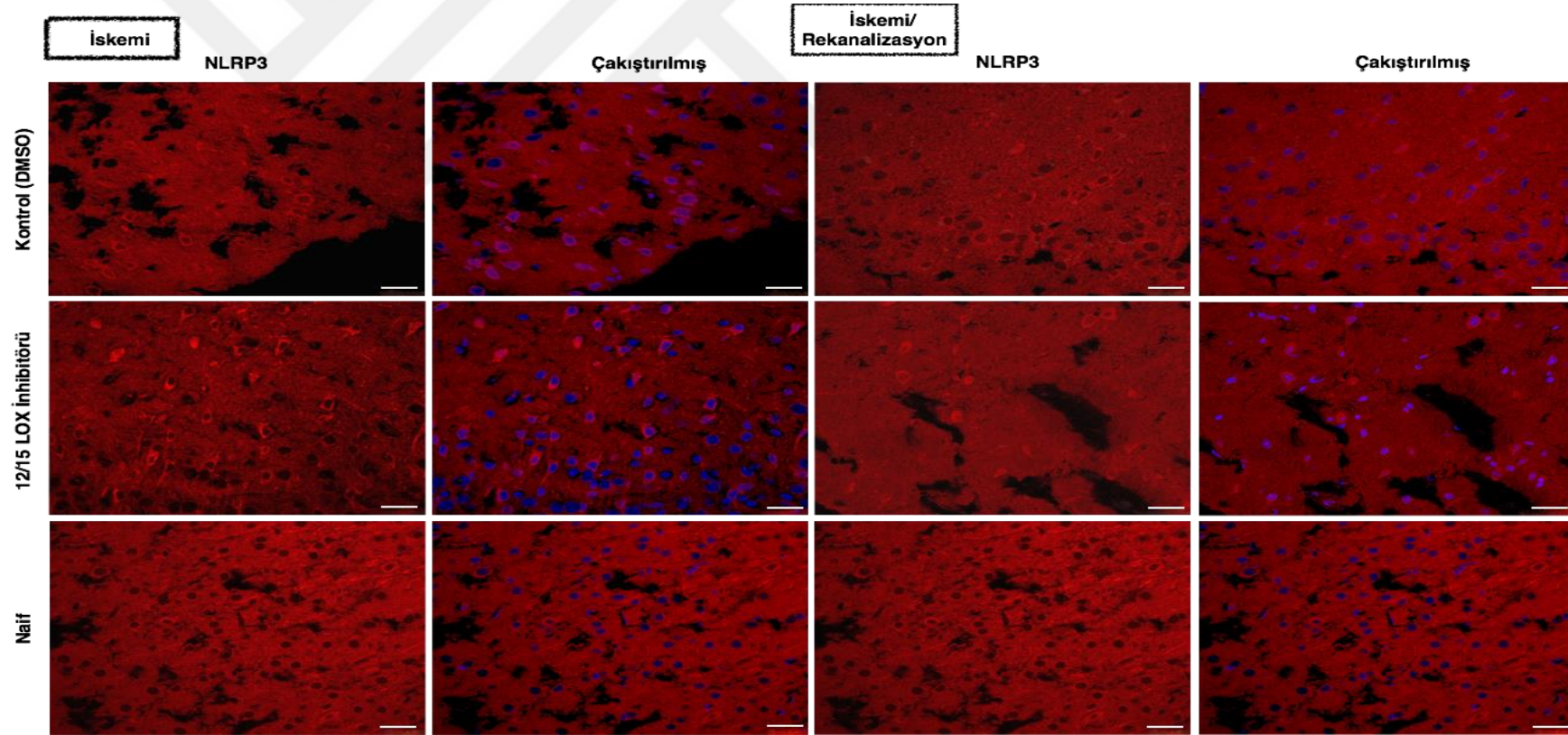




Şekil 4.11. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. İkinci ve dördüncü sütunda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile NLRP3 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 μ m). İskemi fare beyin dokusu kontrol grubunda, NLRP3 immünoaktivitesinin hücrelerin uzantılarına lokalize olduğu ve sinyalin arttığı tesbit edilmiştir. Tedavi grubunda bu tip bir sinyal izlenmemektedir. Az sayıda hücrenin sitoplazmasında NLRP3 işaretlenmesi mevcuttur ve sinyal azalmıştır. İskemi/rekanalizasyon modeli fare beyin kesitlerinden kontrol grubunda sitoplazmik işaretlenme yoğundur. Tedavi grubunda ise şiddeti azalmış olmakla birlikte NLRP3 sitoplazmik işaretlenmesi izlenmektedir.

İskemiden 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda NLRP3 işaretlenmesi az sayıda hücrede ve sitoplazmik iken tedavi grubunda sinyalin arttığı, daha çok sayıda hücrede hem sitoplazmik hem de uzantılarında olduğu izlenmiştir. İskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinde kontrol (DMSO) grubunda NLRP3 işaretlenmesi artmıştır ve sitoplazmada lokalize olduğu saptanmıştır. 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubundan alınan kesitlerde ise NLRP3 sinyalinin azaldığı ve birkaç hücreye sınırlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.12).

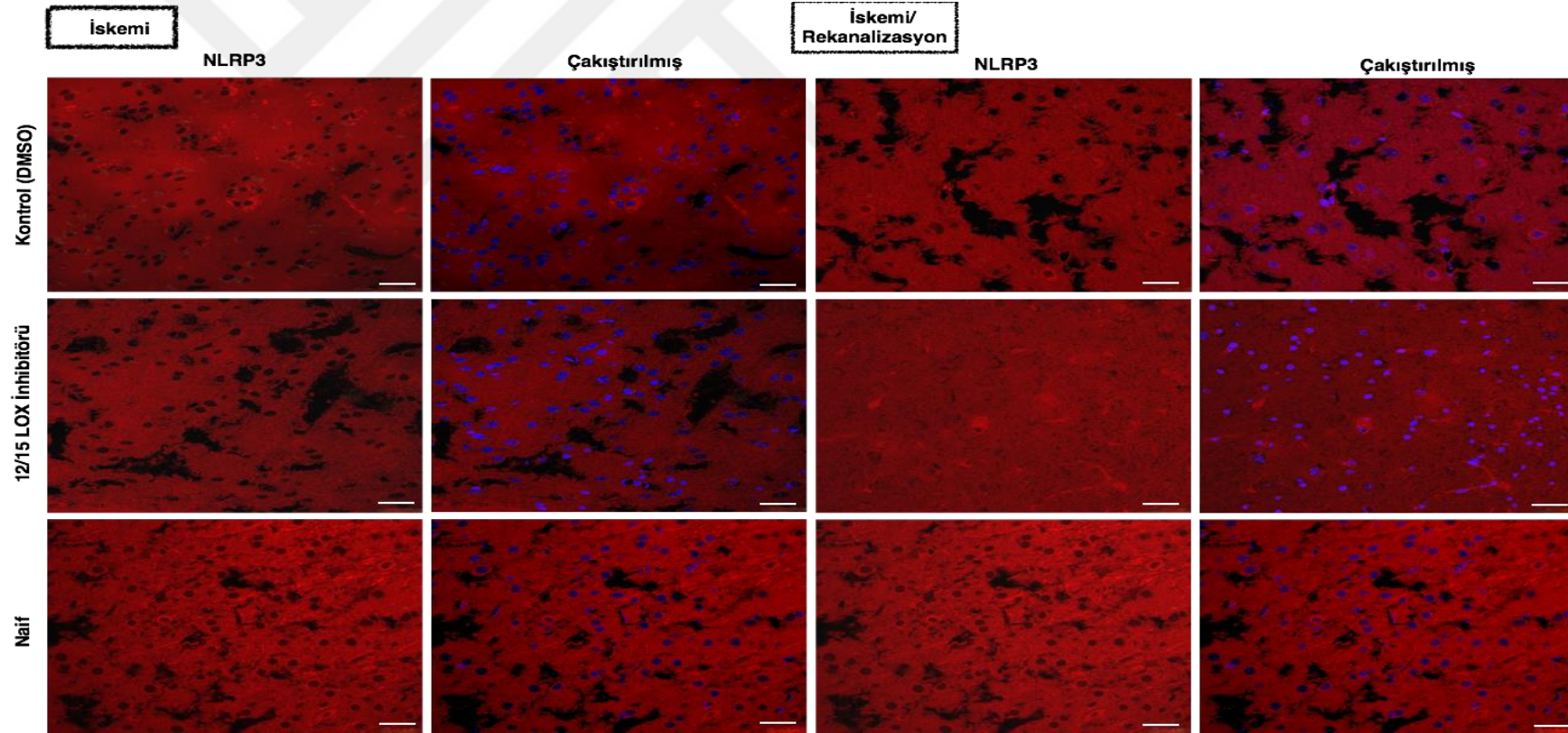




Şekil 4.12. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. İkinci ve dördüncü sütunda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile NLRP3 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). İskemi modeli kontrol grubunda, NLRP3 işaretlenmesi az sayıda hücrede ve sitoplazmik iken tedavi grubunda sinyalin arttığı, daha çok sayıda hücrede hem sitoplazmik hem de uzantılarında olduğu izlenmiştir. İskemi/rekanalizasyon modeli kontrol grubunda, NLRP3 işaretlenmesi artmıştır ve sitoplazmada lokalize olduğu saptanmıştır. 12/15 LOX inhibitörü verilen tedaviden alınan kesitlerde ise NLRP3 sinyalinin azaldığı ve birkaç hücreye sınırlı olduğu görülmektedir.

İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol grubunda NLRP3 işaretlenmesi daha çok hücre uzantılarında ve sadece birkaç hücrenin sitoplazmasında gözlenmektedir. Tedavi grubunda ise NLRP3 immünoreaktivitesine rastlanmamıştır. Bunun NLRP3 protein kompleksinin kullanılıp tüketilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan fare beyin kesitlerinden kontrol grubunda NLRP3 sinyali azalmış ve sadece birkaç hücrede sitoplazmaya lokalize olarak kalmıştır. 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubunda ise NLRP3 işaretlenmesi azalmıştır, sinyal hücre uzantıları ve sitoplazmada lokalizedir (Şekil 4.13).





Şekil 4.13. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, NLRP3 inflamazom protein kompleksi ve hücre çekirdeklerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. İkinci ve dördüncü sütunda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile NLRP3 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). İskemi kontrol (DMSO) grubunda NLRP3 işaretlenmesi daha çok hücre uzantılarında ve sadece birkaç hücrenin sitoplazmasında gözlenmekte iken, tedavi grubunda NLRP3 immünoreaktivitesi tamamen baskılanmıştır. İskemi/rekanalizasyon modeli kontrol (DMSO) grubunda NLRP3 sinyali azalmış ve sadece birkaç hücrede sitoplazmaya lokalize olarak kalmıştır. Tedavi grubunda ise NLRP3 işaretlenmesi azalmıştır, sinyal hücre uzantıları ve sitoplazmada lokalizedir.

Tablo 4.2. NLRP3 inflamazom protein kompleksinin immüno Floresan analiz sonuçları.

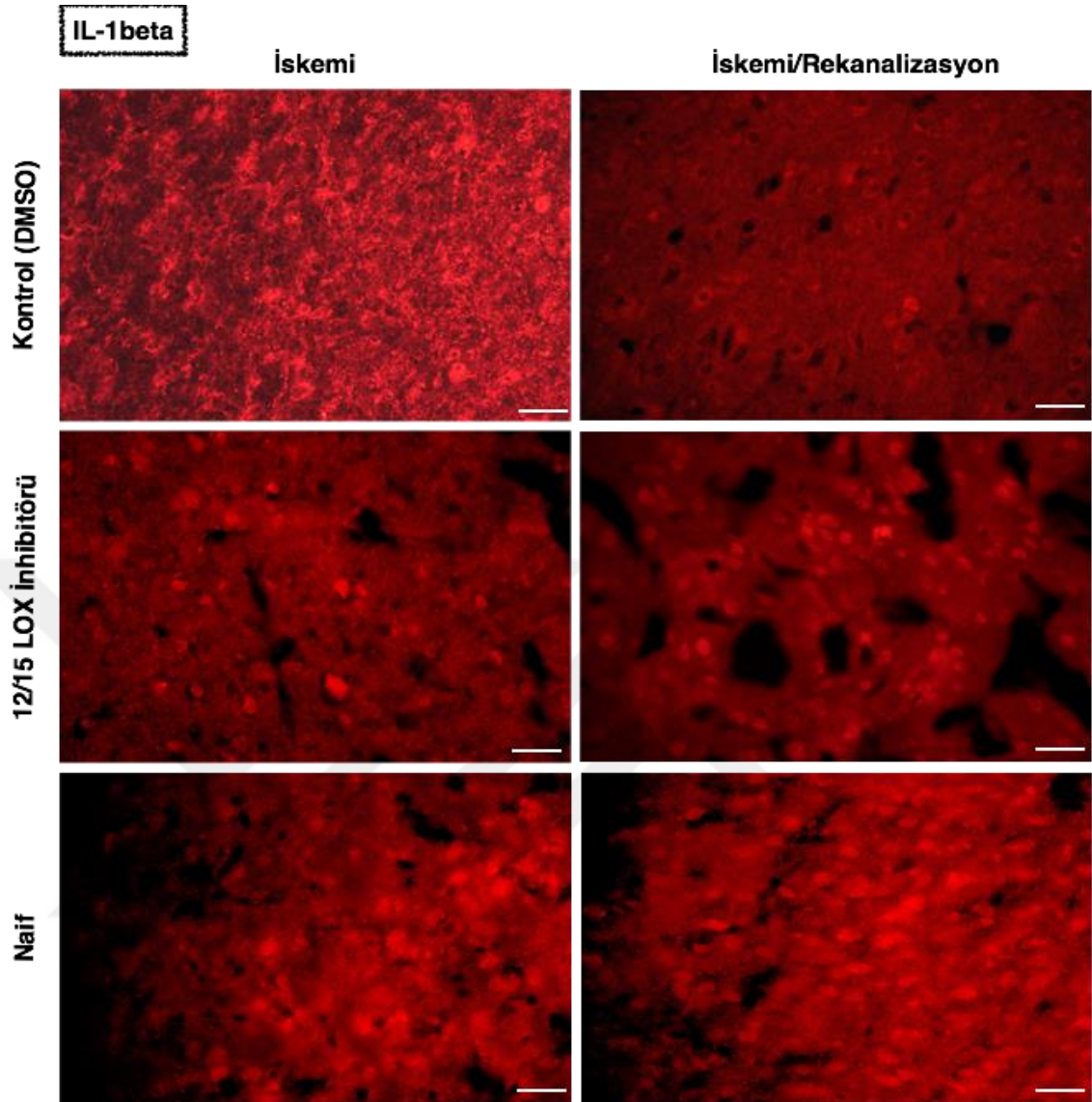
Uygula- ma /tür	İskemi			İskemi/ Rekanalizasyon			Naif
	6 saat	24 saat	72 saat	6 saat	24 saat	72 saat	
Kontrol (DMSO)	Sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı artmıştır. Glial uzantıların işaretlenmesi artmıştır.	Sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı az, NLRP3 kullanılıp tükenmiş olabilir.	Hücre uzantılarında ve birkaç hücrenin sitoplazmasında sinyal var	Sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı ve sinyal şiddeti artmıştır. Mikroglial uzantılarda işaretlenme yoktur.	Sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı az, NLRP3 kullanılıp tükenmiş olabilir.	NLRP3 sinyali azalmış ve sadece birkaç hücrede sitoplazmaya lokalize olarak kalmıştır.	Sitoplazmik & Mikroglial uzantılara benzer yapılarda ifade edilmiştir.
12/15 LOX İnhibitörü (ML351)	Kontrolle göre sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı ve glial uzantılardaki işaretlenme azalmıştır	12/15 LOX inhibisyonu NLRP3 aktivasyon süresini uzatmıştır.	NLRP3 immüno reaktivi tesi tamamen baskılanmıştır.	Sitoplazmik işaretlenen hücre sayısı kontrole göre nispeten azalmıştır. Sinyal şiddeti belirgin düzeyde azalmıştır. Mikroglial uzantılarda işaretlenme yoktur.	12/15 LOX inhibisyonu sitoplazmik NLRP3 ifadesini korumuştur. İnflamasyonu tetiklemiştir. (iba-1)	NLRP3 işaretlenmesi azalmıştır, sinyal hücre uzantıları ve sitoplazmada lokalizedir	

4.4. Serebral İskemi Sonrası İnflamazom Protein Kompleksi İle Aktive Olan IL-1beta'nın İncelenmesi

Doku hasarı sonucu oluşan NLRP1 ve NLRP3 aktivasyonu, hücrelerin sitoplazmasında bulunan proinflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesine ve hücre dışına salınmasına neden olmaktadır. Serebral iskeminin tetiklediği nöroinflamasyonda IL-1beta'nın, iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda ve farklı zaman noktalarında (6, 24, 72 saat) elde edilen fare beyin kesitlerindeki immünoaktivitesi immünohistokimya yöntemi ile, kantitatif değişimi ise ELISA yöntemi ile incelenmiştir.

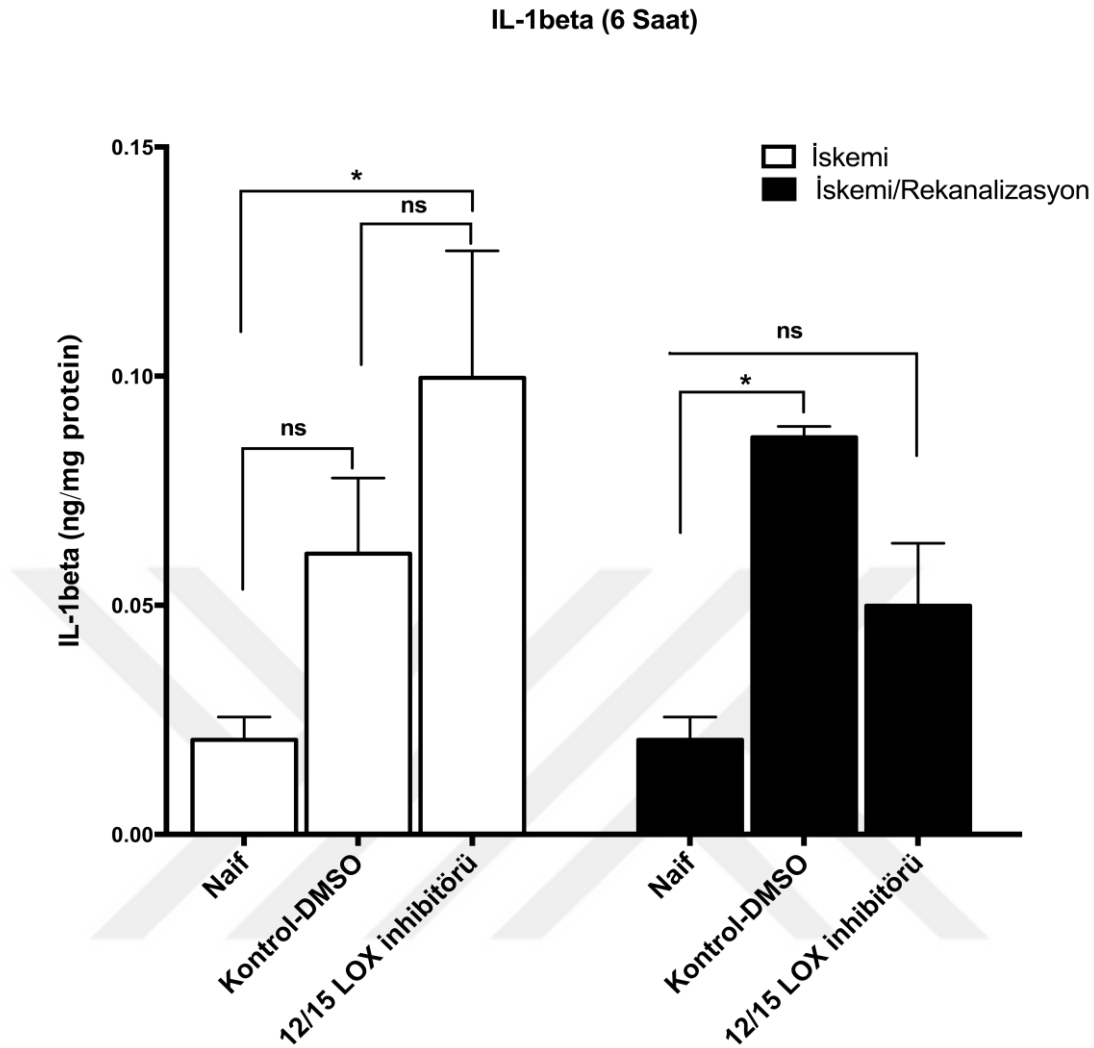
İskemiden 6 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda enfarkt ve peri-enfarkt alanlarda IL-1beta immünohistokimyasal işaretlenmesinin yoğun olduğu, hem hücrelerde hem de uzantılarında yaygın olarak bulunduğu görülmektedir. IL-1beta immünoaktivitesinin bu kadar yaygın olmasının nedeni hem nöronda hem de mikrogliada aktivitesinin artması olabilir. 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubunda ise sinyalin azaldığı ve birkaç hücreye lokalize olduğu, işaretlenme şeklinin naif gruba benzer olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.14).

İskemi/rekanalizasyon modelinin oluşturulduğu kontrol (DMSO) grubunda IL-1beta işaretlenmesinin sitoplazmaya lokalize olduğu, tedavi grubunda ise sinyalin hücresel yerleşim göstererek naif gruba benzediği görülmektedir (Şekil 4.14). Sitoplazmik yerleşimin nedeni IL-1betanın aktive olması ve kullanılması olabilir. Bu bulgular her iki iskemi modelinde de 12/15 LOX inhibisyonunun inflamatuvar süreci baskıladığına işaret etmektedir.



Şekil 4.14. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). En alt satırda naif beyin kesitlerinde IL-1beta sinyalinin hücreyel olduğu izlenmektedir. İskemi modeli uygulanan ve DMSO verilen kontrol grubundan elde edilen beyin kesitinde ise IL-1beta immünoreaktivitesinin arttığı, hem hücrelerde hem de hücreyel uzantılarında yaygın olarak bulunduğu görülmektedir. 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubunda ise IL-1beta sinyalinin azaldığı ve birkaç hücreye lokalize olduğu, işaretlenme şeklinin naif gruba benzer olduğu gözlenmektedir. İ/R modelinin oluşturulduğu kontrol (DMSO) grubunda IL-1beta işaretlenmesi iskemi modelinin kontrol grubuna göre azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur. Tedavi grubunda ise sinyal hücreyel yerleşim göstererek naif gruba benzerlik göstermiştir.

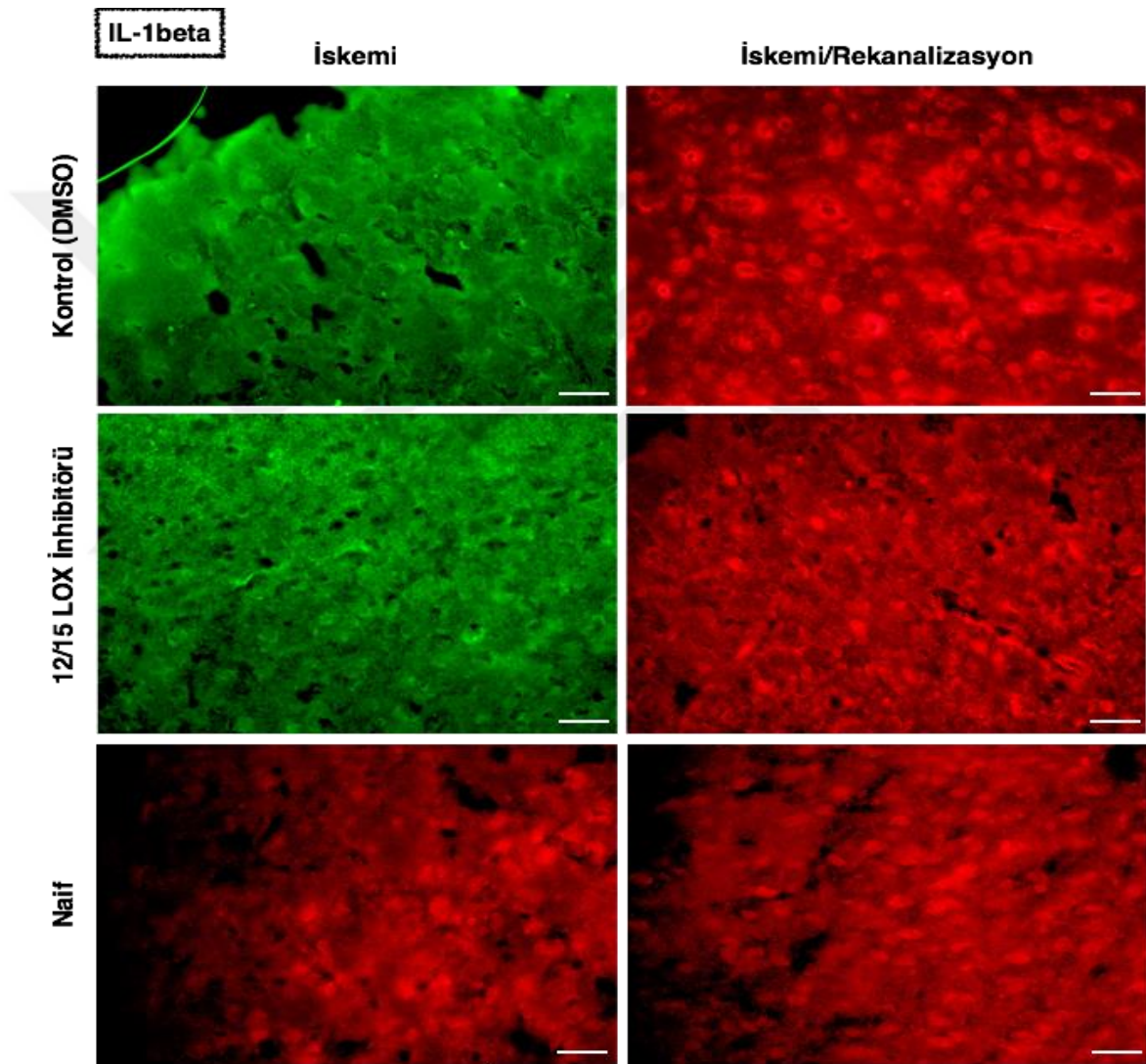
İskemi modeli uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile IL-1beta miktar analizi yapılmıştır. Buna göre kontrol ve tedavi gruplarında naif beyne göre artış olmakla birlikte, sadece tedavi grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0109$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.15). Bunun nedeni kalıcı iskemi modeli ile uyarılmış olan inflamasyonun erken döneminde IL-1beta uyarımının az olması veya gruplardaki denek sayısının yetersiz olması olabilir. İskemi/rekanalizasyon modelinde ise naif gruba göre kontrol grubunda izlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0333$; $n=3/\text{grup}$). İnhibitör verilen tedavi grubunda IL-1beta miktarı, kontrol grubuna göre azalma eğilimi göstermiştir. Fakat bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin dokularında IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modeli uygulanan farelerde IL-1beta miktarı kontrol ve tedavi gruplarında artmıştır. Tedavi grubundaki artış naif gruba göre istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p=0,0109$; $n=3$ /grup). İ/R modelinde naif gruba göre kontrol grubunda IL-1beta miktarı anlamlı oranda artmıştır (* $p=0,0333$; $n=3$ /grup). IL-1beta miktarı kontrol gruba göre tedavi grubunda azalma eğilimi göstermiştir ($p>0,05$; $n=3$ /grup).

İskemiden 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda enfarkt ve peri-enfarkt alanlarda IL-1beta immünohistokimyasal işaretlenmesinin yoğun olduğu ve hücrede yaygın olarak bulunduğu görülürken, tedavi grubunda ise sadece sitoplazmik işaretlenmenin olduğu görülmektedir (Şekil 4.16). Bu bulgu IL-1beta'nın inflamasyona yanıt olarak aktive olup hücreden salıverilmesine bağlı olabilir. İskemi/rekanalizasyon modelinin oluşturulduğu kontrol

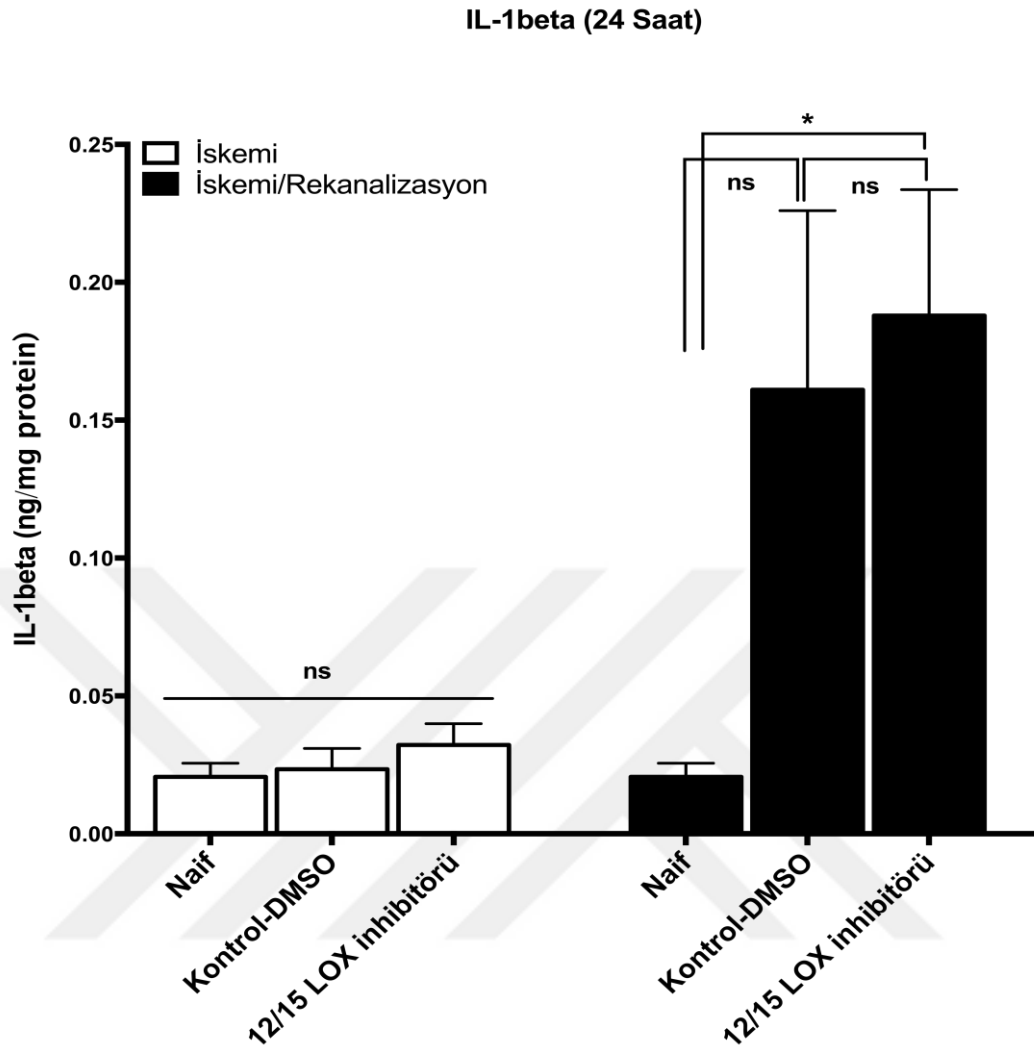
(DMSO) grubunda sitoplazmik ve diffüz IL-1beta işaretlenmesi belirgin şekilde artmıştır. İşaretlenmenin diffüz bir şekilde olması IL-1beta'nın hücre dışına salınımının göstergesi olabilir. Tedavi grubunda ise IL-1beta immünoreaktivitesinin azaldığı ve daha çok hücresel yerleşim gösterdiği izlenmektedir (Şekil 4.16). Bu bulgular her iki iskemi modelinde de 12/15 LOX inhibisyonunun perienfarkt alanda inflamatuvar yanıtı baskıladığına işaret edebilir.



Şekil 4.16. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi modeli kontrol (DMSO) grubundan alınan beyin kesitinde IL-1beta immünohistokimyasal işaretlenmesinin arttığı ve hücrede yaygın olarak bulunduğu görülürken, tedavi grubunda ise sadece sitoplazmik işaretlenmenin olduğu görülmektedir (sol sütun).

İskemi/rekanalizasyon modeli kontrol (DMSO) grubundan alınan kesitte sitoplazmik ve diffüz IL-1beta işaretlenmesinin arttığı, tedavi grubunda ise IL-1beta immünoreaktivitesinin azaldığı ve daha çok hücrel yerleşim gösterdiği izlenmektedir (sağ sütun).

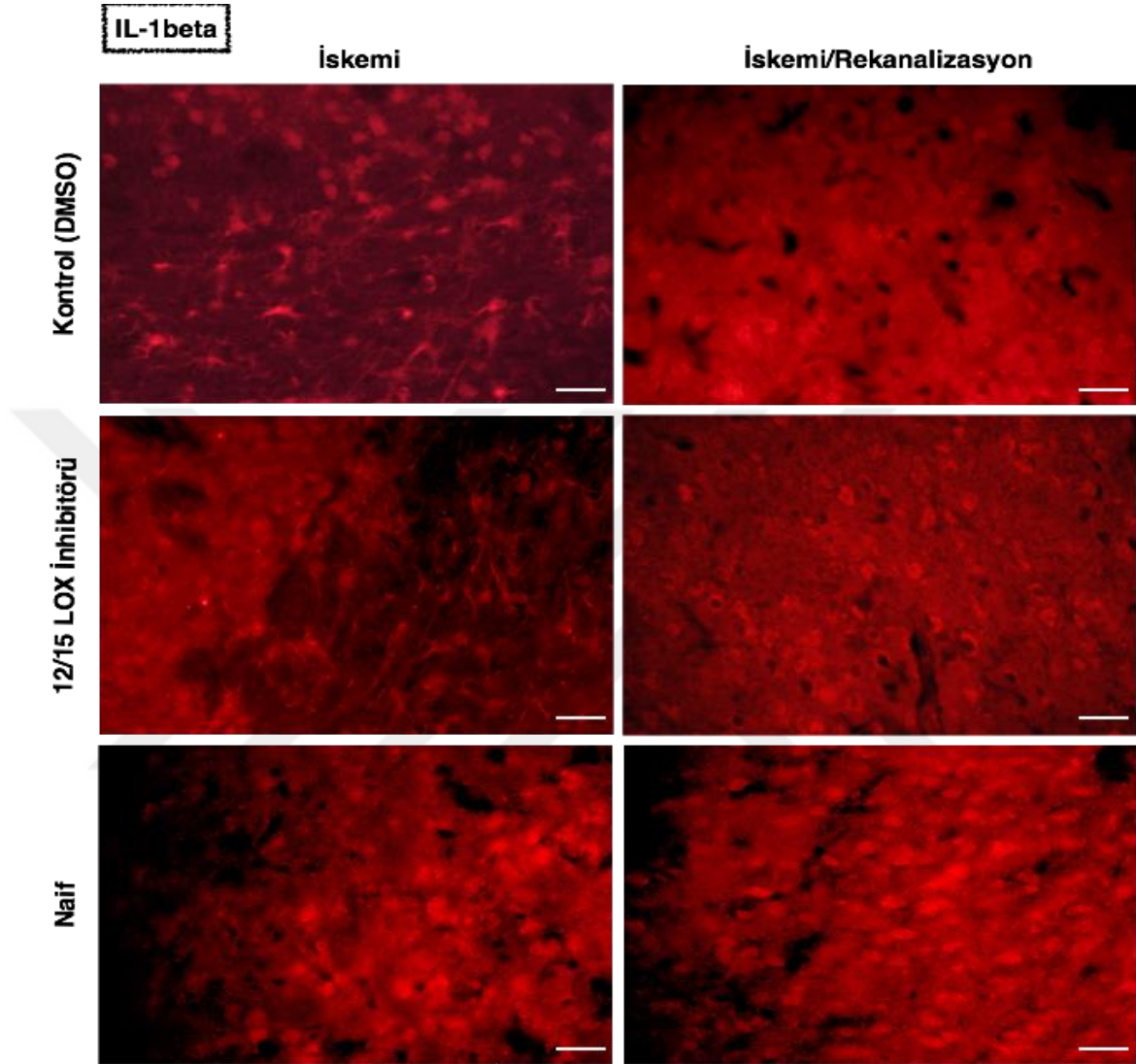
İskemi modeli uygulanan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile saptanan IL-1beta miktarları gruplar arasında farklılık göstermemektedir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.17). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise kontrol ve tedavi gruplarında ölçülen IL-1beta miktarı naif gruba göre artmıştır. Sadece naif ve tedavi grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p= 0,0422$ $n=3/\text{grup}$). Tedavi grubunda ölçülen IL-1beta miktarı kontrol grubuna göre artma eğilimi gösterirken, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modeli oluşturulan fare beyinlerinde ölçülen IL-1beta miktarının gruplar arasında farklı olmadığı belirlenmiştir (ns; $p>0,05$; $n=3$ /grup). İ/R modelinde ise IL-1beta miktarı kontrol ve tedavi gruplarında naif gruba göre artış göstermiştir. Tedavi grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p=0,0422$; $n=3$ /grup).

İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda IL-1beta immünohistokimyasal işaretlenmesi hem hücresel ve hem de hücre uzantılarında izlenmektedir. Tedavi grubunda sinyal şiddeti azalmakla birlikte IL-1beta işaretlenmesi bakımından fark bulunmamaktadır (Şekil 4.18). İskemi/rekanalizasyon modelinde kontrol (DMSO) grubunda IL-1beta sinyali artmış ve yer yer hücresel yer yer sitoplazmik işaretlenme dikkati çekmektedir. Tedavi

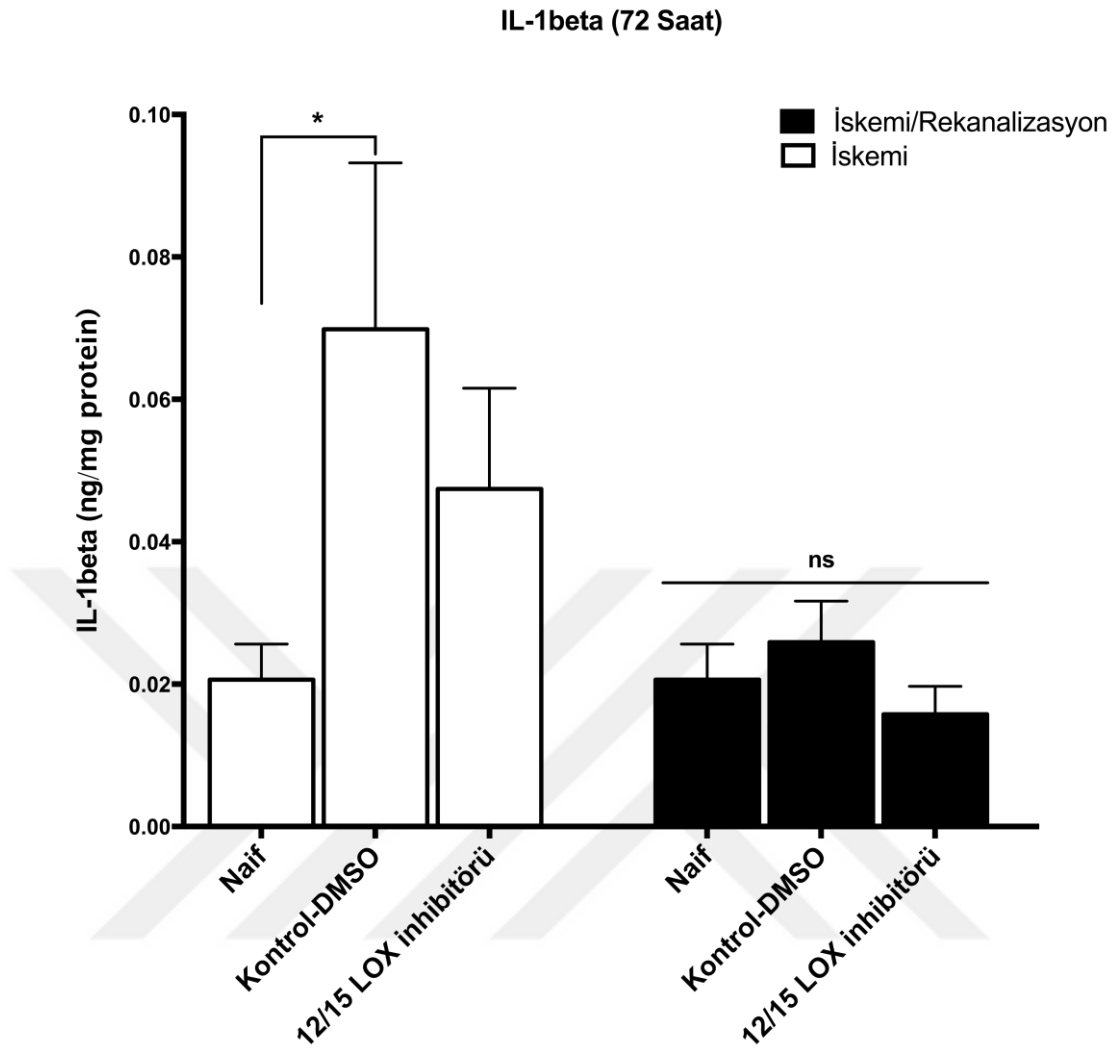
grubunda ise IL-1beta işaretlenme şiddeti kontrole göre azalmıştır ve daha çok sitoplazmik lokalizasyon görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflatuvar sitokin olan IL-1beta proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi modeli kontrol kesitinde, IL-1beta sinyali hem hücresel ve hem de hücre uzantılarında izlenmektedir. Tedavi grubunda ise sinyal şiddeti azalmakla birlikte IL-1beta işaretlenme şekli bakımından fark bulunmamaktadır (Sol sütun). İskemi/rekanalizasyon grubuna ait kontrol kesitinde IL-1beta işaretlenmesi artmış ve yer yer hücresel, yer yer sitoplazmik işaretlenme saptanmıştır. Tedavi grubunda ise IL-1beta işaretlenme şiddeti kontrole göre azalmıştır ve daha çok sitoplazmik lokalizasyon görülmektedir (sağ sütun).

İskemi modeli uygulandıktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokularında IL-1beta protein miktarları ölçülmüştür. Buna göre kontrol grubunda naif gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (* $p=0,0458$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi grubunda naif gruba göre izlenen artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,3265$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi grubunda kontrol gruba göre IL-1beta miktarı azalma eğilimi göstermiştir. Fakat aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,3908$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.19). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise naif, kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). Ancak tedavi grubunda IL-1beta miktarı kontrole göre azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.19).

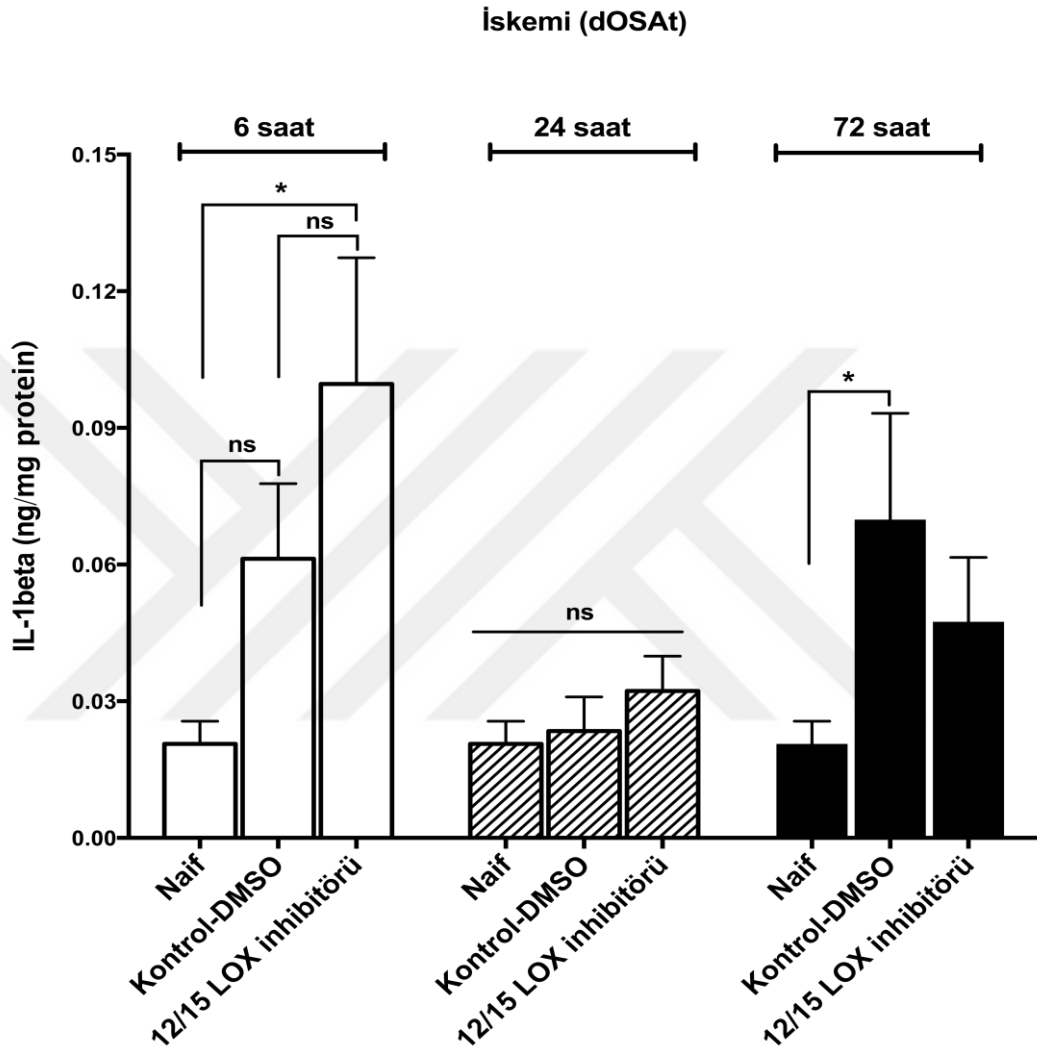




Şekil 4.19. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-1beta protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modeli kontrol grubunda IL-1beta miktarı naif gruba göre artış göstermiştir (* $p=0,0458$; $n=3$ /grup). Kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına karşın, IL-1beta miktarı tedavi grubunda azalma eğilimi göstermiştir ($p>0,05$; $n=3$ /grup). İ/R modeli uygulanan kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$; $n=3$ /grup).

Şekil 4.20’de kalıcı iskemi modeli oluşturulduktan 6, 24 veya 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularından elde edilen IL-1beta sitokin miktarları (ng/mg protein) karşılaştırılmıştır. 6 ve 72. saatlerde dokuda IL-1beta miktarı inflamasyonun erken ve geç dönemlerinde artmıştır. 6. saatte artan IL-1beta seviyesi uyarının 24. saatinde tekrar naif dokuda belirlenen seviyeye yaklaşmıştır. Zamansal olarak kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

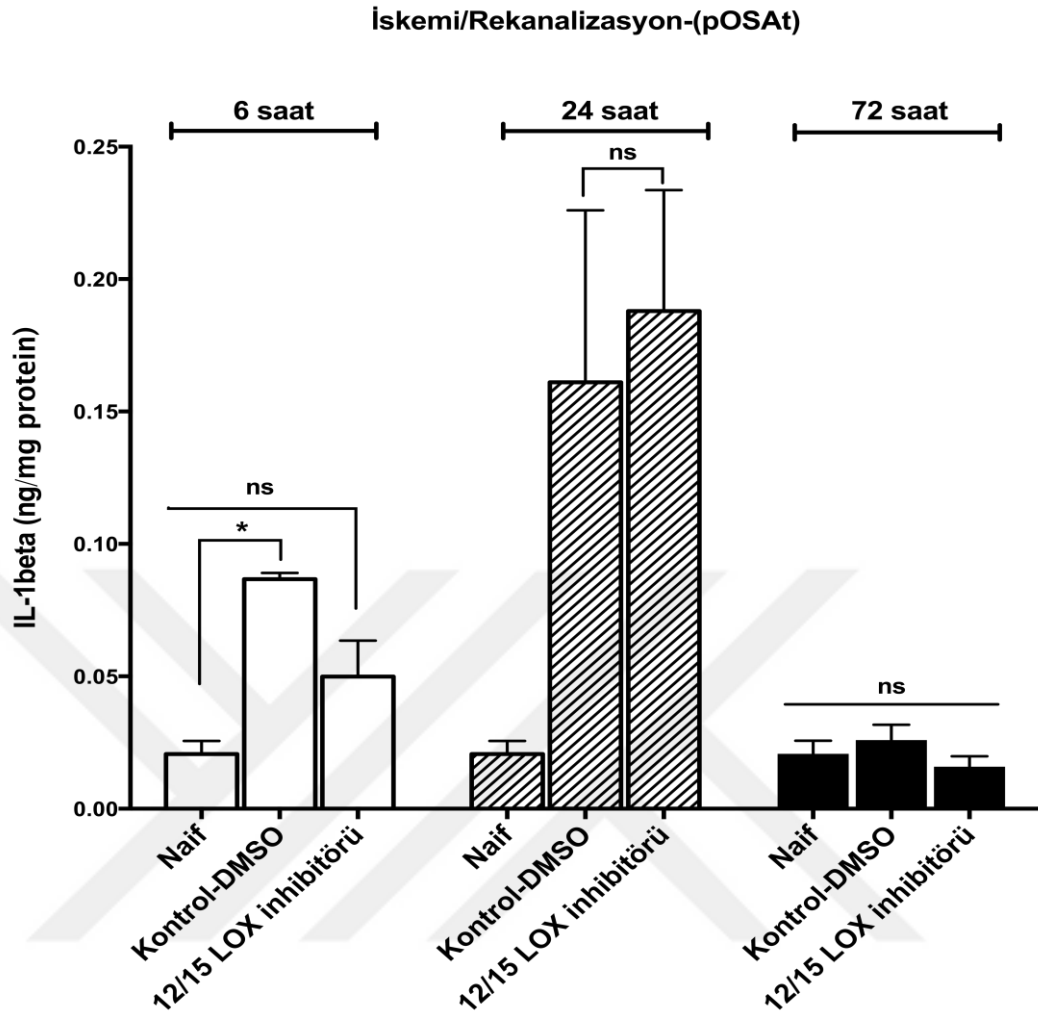
Tedavi ile IL-1beta seviyesi iskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerde azalma eğilimi göstermiş olmasına karşın, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,0793$; $n=3/\text{grup}$).



Şekil 4.20. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-1beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. İskemi modeli oluşturulduktan 1 saat sonra DMSO (i.p.) verilen kontrol grubu fareler 6, 24 veya 72 saat sonra sakrifiye edilmiştir. 6 ve 72. saatlerde dokuda IL-1beta miktarı inflamasyonun erken ve geç dönemlerinde artmıştır. 6. saatte artan IL-1beta seviyesi uyarının 24. saatinde tekrar naif dokuda belirlenen seviyeye yaklaşmıştır. Zamansal olarak kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Tedavi ile IL-1beta seviyesi iskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerde azalma eğilimi göstermiş olmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,0793$; $n=3/\text{grup}$).

Şekil 4.21’de iskemi/rekanalizasyon modelleri farklı zaman noktaları biraraya getirilerek incelenmiştir. IL-1beta ifadesinin ELISA bulgularına dayanarak kalıcı

iskemi modelinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken, iskemi/rekanalizasyon modelinde 6 ve 24. saat gruplarında IL-1beta artışının DMSO verilen kontrol grubu farelerde maksimum olduğu ($p=0,2989$; $n=3/\text{grup}$) ve 72. saatte yani iskemi/rekanalizasyon hasarı ile indüklenmiş olan inflamasyonun subakut fazında baskılandığı söylenebilir. Dolayısı ile IL-1beta iskemiden sonra erken dönemde rol alan bir proinflamatuvar sitokindir. Bu bulgular hücresel IL-1beta yanıtını incelemek için akut iskemi/rekanalizasyon modellerinin uygun olduğunu göstermektedir. İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan 6 ve 72 saat tedavi grubu farelerin beyin dokusunda kontrole göre IL-1beta miktarı azalmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Denek sayısının artırılması ile anlamlı sonuçların elde edilebileceği düşünülmüştür.



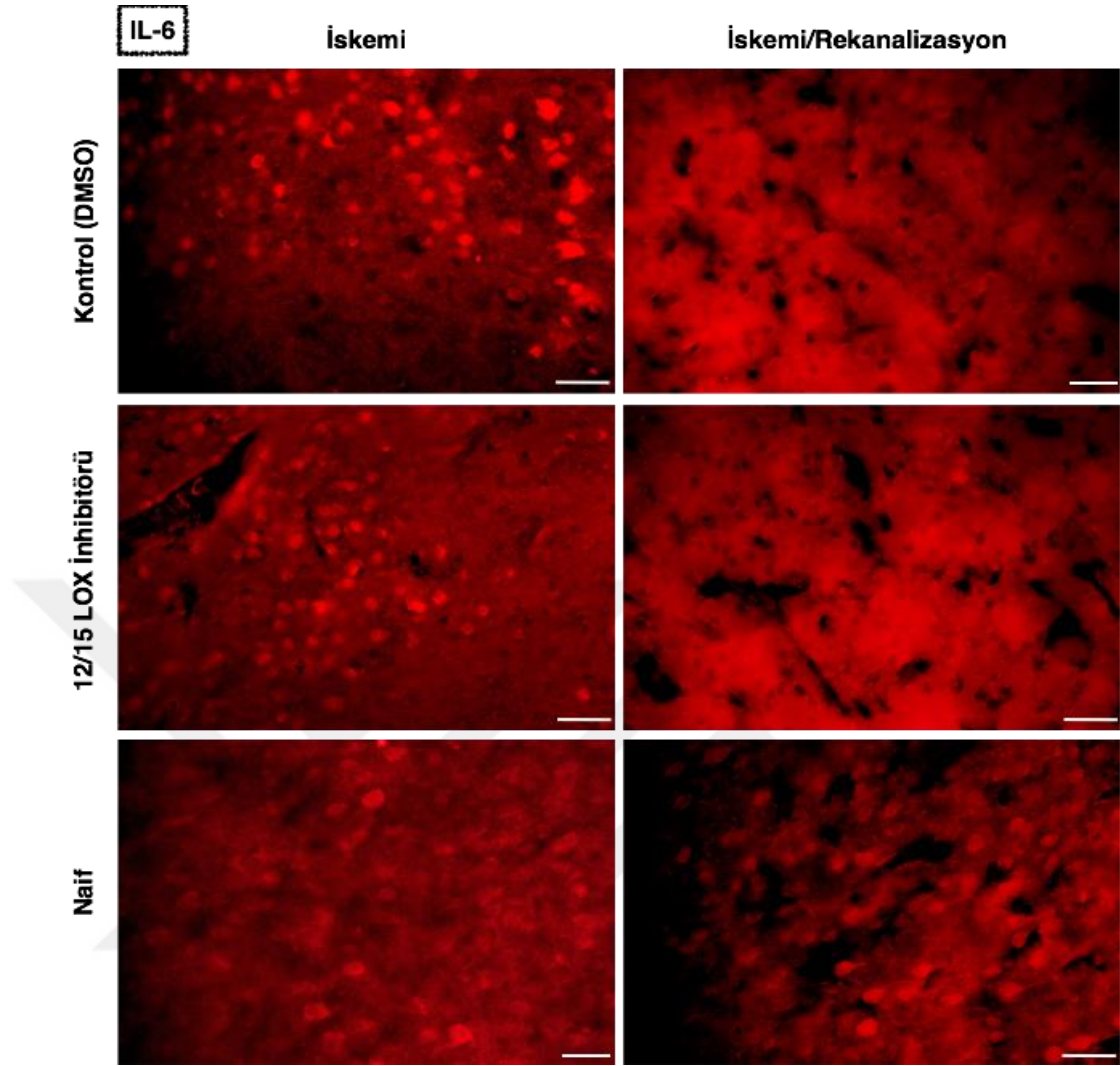
Şekil 4.21. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-1beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. Hücresel IL-1beta yanıtı iskemi/rekanalizasyonun 6. ve 24. saatlerinde görülmektedir. Subakut dönemi temsil eden 72. saatte IL-1beta seviyesinin naif dokuya yaklaştığı görülmektedir. Bu bulgu IL-1beta yanıtının iskemi/rekanalizasyon modeli ile indüklenen inflamatuvar yanıtın erken dönemlerinde olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi ile 6 ve 72. saatlerde IL-1beta seviyelerinde azalma eğilimi görülürken, 24. saatte artış eğilimi saptanmıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$).

4.5. Serebral İskemi Sonrası Proinflamatuvar IL-6 ve TNF-alfa Sitokin Yanıtının İncelenmesi

IL-6 proinflamatuvar sitokinlerdendir. Ancak serebral iskemi çalışmalarında IL-6'nın etkisinin iki yönlü olabileceği vurgulanmaktadır. Örneğin iskeminin akut döneminde proinflamatuvar etki gösterirken, kronik dönemde nörotrofik bir mediyatör olarak görev alabilir (109).

Bu tez çalışmasında serebral iskeminin tetiklediği nöroinflamasyonda IL-6'nın, iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda ve farklı zaman noktalarında (6, 24, 72 saat) elde edilen fare beyin kesitlerindeki immünoaktivitesi immünohistokimya yöntemi ile ve kantitatif değişimi ise ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Naif beyin kesitinde IL-6 sinyalinin hücresel olduğu görülmektedir. İskemi modeli oluşturulmuş ve 6 saat sonra sakrifiye edilmiş fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin arttığı ve hücresel olduğu izlenmektedir. Tedavi grubunda işaretlenme şiddeti kısmen azalmakla birlikte sinyal şekli değişmeyip hücresel kalmıştır (Şekil 4.22; sol sütun).

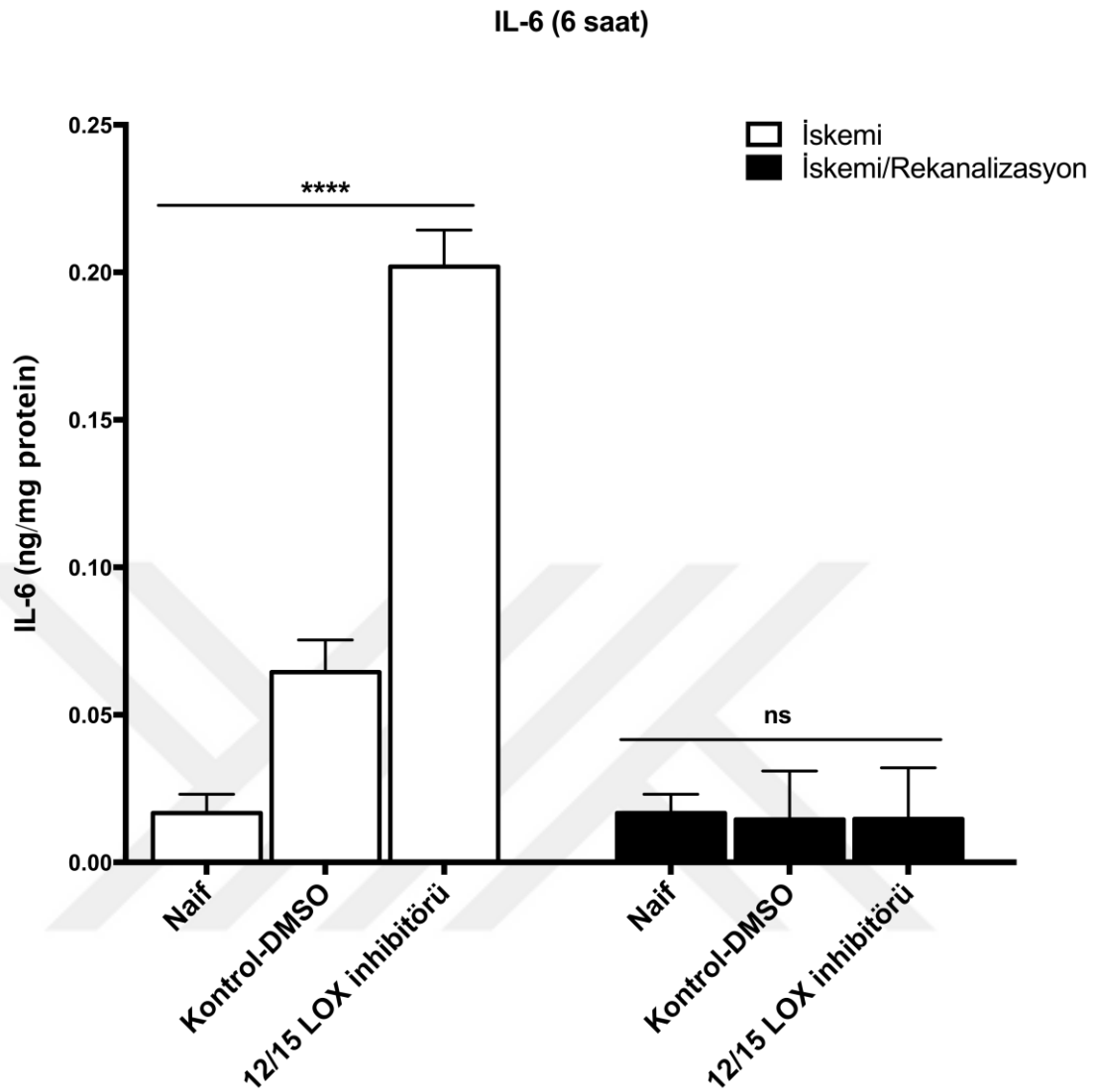
İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin hem sitoplazmik hem de hücresel ve difüz bir işaretlenme şekli izlediği saptanmıştır. Bu boyanma şekli IL-6'nın hücreden salıverilmesine bağlı olabilir. İskemi/rekanalizasyon kontrol grubu, iskemi modelinin kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-6 işaretlenme şeklinin değiştiği görülmektedir. Naif olarak belirtilen sağlıklı fare beyin dokusunda yer yer sitoplazmik işaretlenmelerin varlığı, iskemi modeli kontrol ve tedavi gruplarında gözlenmemektedir. 12/15 LOX inhibitörü (ML351) verilmiş tedavi grubu farelerde sitoplazmik ve difüz işaretlenmenin devam ettiği ve kontrol grubu ile aralarında belirgin fark olmadığı görülmektedir. Bu bulgular iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan farelerde 12/15 LOX inhibisyonunun rekanalizasyonun 6. saatinde enfarkt alanını çevreleyen hücre yanıtında, IL-6 ifadesi bakımından etki göstermediğini düşündürmektedir (Şekil 4.22; sağ sütun).



Şekil 4.22. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, proinflamatuar sitokin olan IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Naif beyin kesitinde IL-6 sinyalinin hücrel ve bazı hücrelerde sadece sitoplazmada yerleştiği görülmektedir (en alt satır). İskemi modeli oluşturulmuş fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin arttığı ve hücrel olduğu izlenmektedir. Tedavi grubunda işaretlenme şiddeti kısmen azalmakla birlikte, işaretlenme şekli değişmeyip hücrel kalmıştır (soldaki sütun). İ/R modeli uygulanan fare beyin kesitlerinden kontrol örneğinde IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin hem sitoplazmik hem de hücrel ve difüz bir şekil izlediği saptanmıştır. 12/15 LOX inhibitörü verilmiş tedavi grubu farelerde sitoplazmik ve difüz işaretlenmenin devam ettiği ve kontrol grubu ile aralarında belirgin fark olmadığı görülmektedir (sağdaki sütun).

İskemi modeli uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile incelenen IL-6 ifade analizinde kontrol

ve tedavi gruplarında naif beyne göre artış varken, kontrole göre tedavi grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır (**** $p < 0,0001$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.23). İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokularında IL-6 miktarı naif, kontrol ve tedavi grupları arasında farklı değildir ($p > 0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.23). 12/15 LOX inhibitörü kalıcı iskeminin 6. saatinde IL-6 ifadesini naif beyne göre yaklaşık 12 kat, kontrol beynine göre yaklaşık 3 kat artırmıştır. İ/R modelinde ise erken dönemde IL-6 miktarı naif gruba oranla tedavi ve kontrol gruplarında değişmeden kalmıştır. Kalıcı iskemi ve İ/R modelinde serebral iskemiden sonraki erken dönemde, IL-6 miktarındaki değişiklik modeller arasında farklılık göstermektedir. Bu bulgu her iki modelde de serebral iskemi sonrası indüklenen inflamatuvar yanıtın farklı olduğunu düşündürmektedir. Kalıcı iskemi modelinde 12/15 LOX inhibitörünün IL-6 artışına neden olması, bu modelde IL-6'nın serebral iskemi sonrası erken dönemden itibaren koruyucu bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

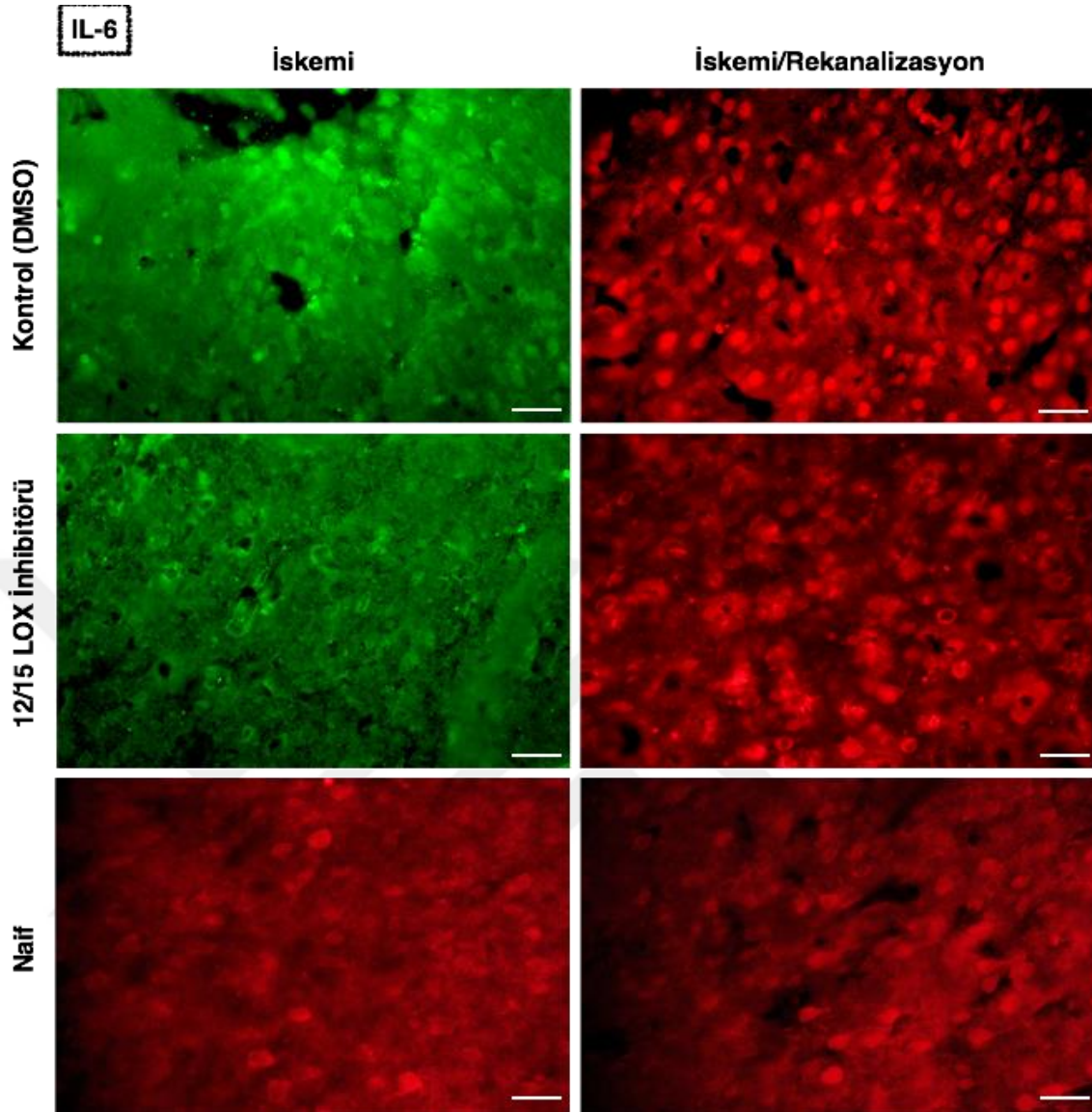


Şekil 4.23. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin dokularında IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modeli uygulanan tedavi grubu farelerde IL-6 miktarı kontrole göre artmıştır (**** $p < 0,0001$; $n=3$ /grup). 12/15 LOX inhibitörü kalıcı iskeminin 6. saatinde IL-6 ifadesini naif beyne göre yaklaşık 12 kat, kontrol beynine göre yaklaşık 3 kat artırmıştır. İ/R modelinde ise IL-6 miktarı gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$; $n=3$ /grup).

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin arttığı ve hücresel olduğu görülmektedir. Tedavi grubunda ise sinyal baskılanmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (Şekil 4.24; sol sütun). Bu beyin kesitlerinde FITC sekonder antikoru ile işaretleme yapılmıştır. Bunu farklı sekonder

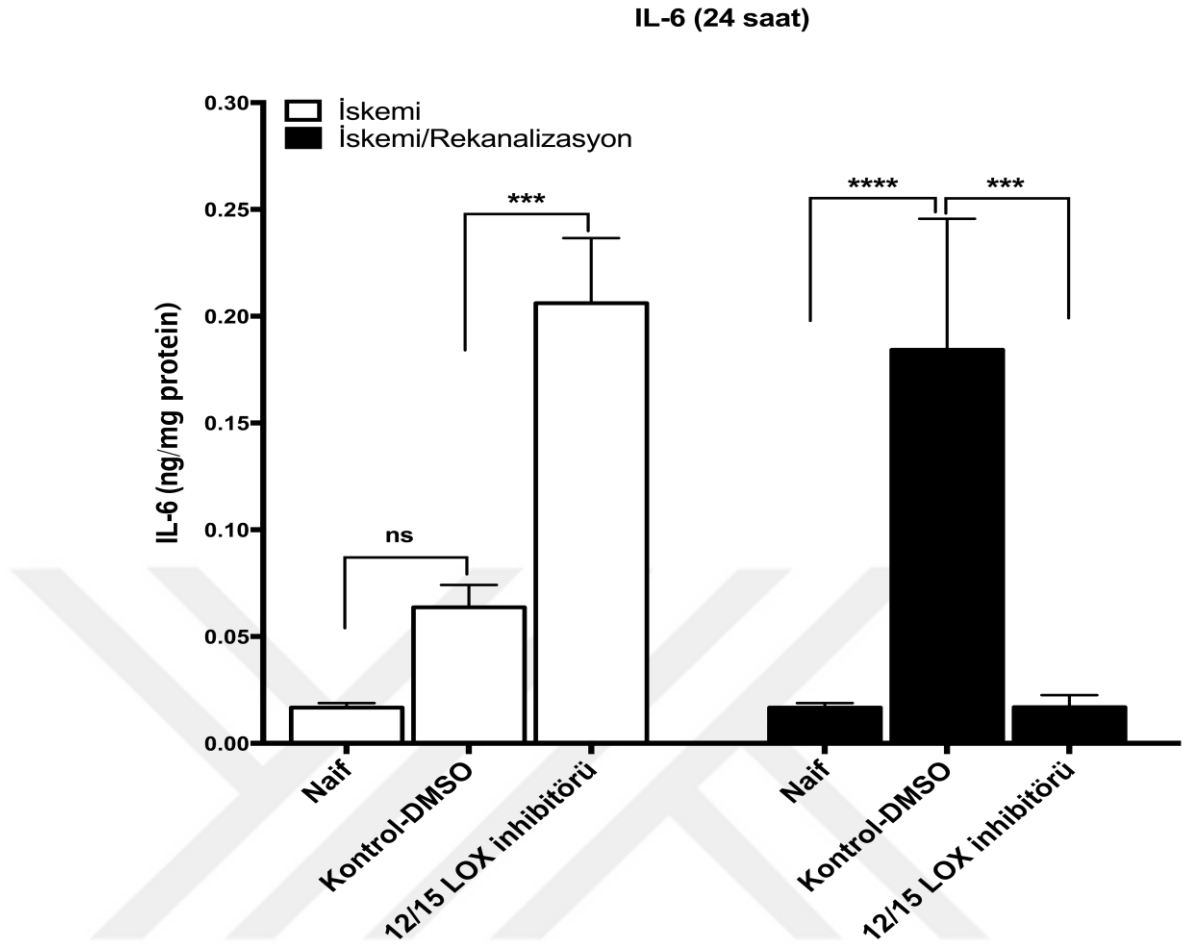
ile sinyalin değişip değişmediğinden emin olmak ve boyama protokolümüzü optimize etmek istedik. Buna göre tedavi grubunda hücre içinde depolanmış olan IL-6 proteini aktive olmuş ve hücre dışına salıverilmış olabilir (şekil 4.24; soldaki sütün).

İşkemi/rekanalizasyon modeli uygulanan fare beyin kesitlerinden kontrol grubu rneğinde IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin, iskemi grubuna kontrol kesatine benzer şekilde arttığı ve hücresel olduğu görülmektedir. 12/15 LOX inhibitörü verilmiş tedavi grubu fare beyin kesitinde ise IL-6 sinyali kontrole göre azalmış, sitoplazmik ve hücresel yerleşim göstererek naif beyin dokusu ile benzer işaretlenme şekli göstermiştir (şekil 4.24; sağdaki sütün). Bu bulgular iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan farelerde 12/15 LOX inhibisyonunun rekanalizasyonun 24. saatinde peri-enfarkt alanda inflamatuvar yanıtı baskıladığına işaret edebilir.



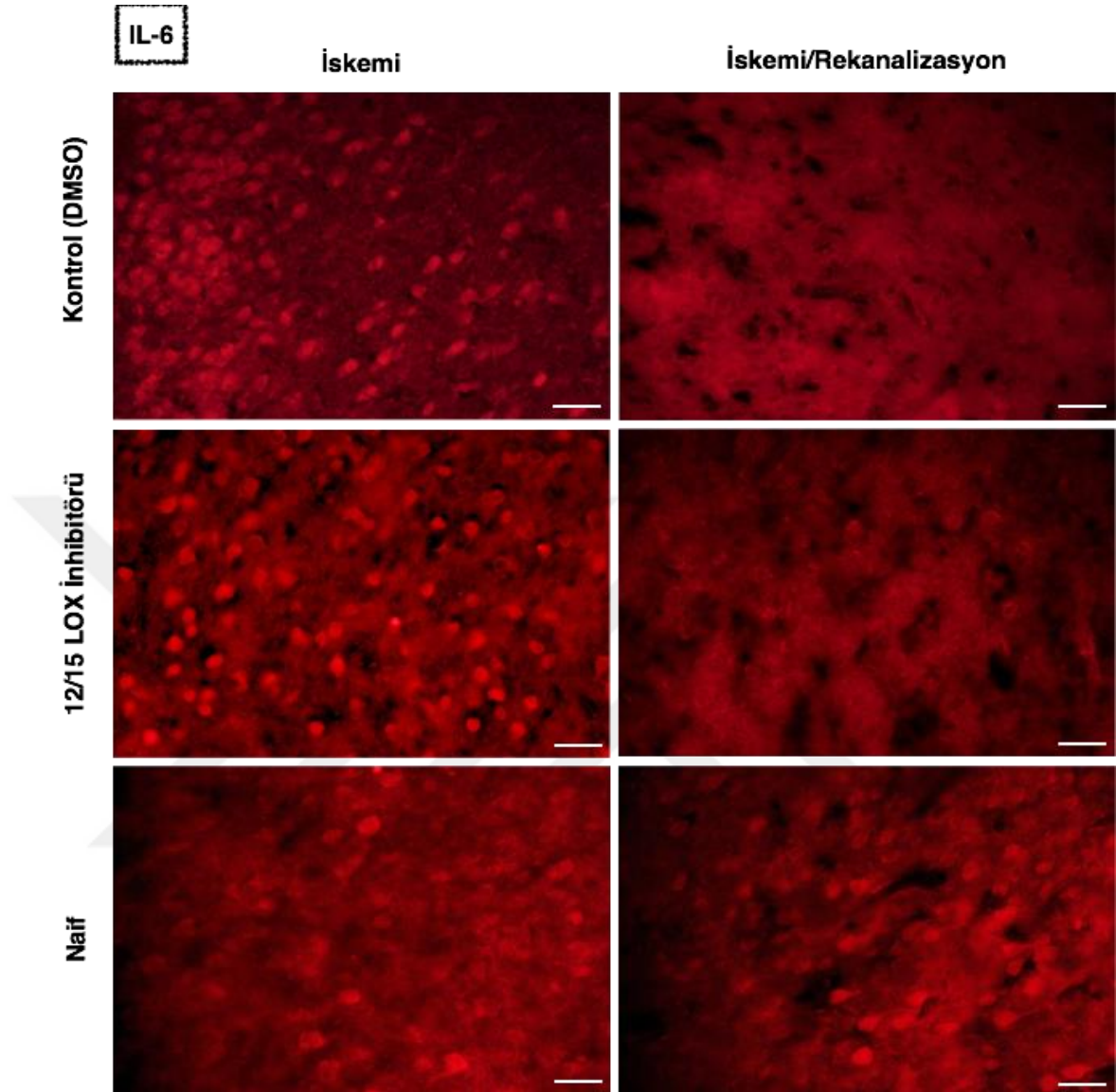
Şekil 4.24. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). DMSO verilen kontrol grubu örneğinde, IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin arttığı ve hücresel olduğu görülmektedir. Tedavi grubunda ise sinyal baskılanmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (soldaki sütun). İ/R modeli uygulanan fare beyin kesitlerinden kontrol grubu örneğinde IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinde artış izlenmektedir, sinyal hücrelidir. 12/15 LOX inhibitörü verilmiş tedavi grubu fare beyin kesitinde ise IL-6 sinyali kontrole göre azalmış, sitoplazmik ve hücresel yerleşim göstererek naif beyin dokusu ile benzer işaretlenme şekli göstermiştir (sağdaki sütun).

İskemi modeli uygulanan ve iskemiden 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile incelenen IL-6 ifade analizinde kontrol ve tedavi gruplarında naif örneğe göre artış saptanmıştır (Şekil 4.25). Kontrol grubundaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı değilken, tedavi grubundaki IL-6 artışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). İskemiden 6 saat sonra kontrol grubuna göre tedavi grubunda saptanan IL-6 miktarındaki artış ve IL-6 miktarı, iskemiden 24 saat sonra da aynı seviyede kalmıştır. Buna göre, kalıcı iskemi modelinde 12/15 LOX inhibitörünün IL-6 artışına neden olması, bu modelde IL-6'nın serebral iskemi sonrası 24. saatte de koruyucu etkisinin devam ettiğini düşündürmektedir. 6 ve 24. saat iskemi modellerinde kontrol grubu dokuların IL-6 miktarları sırasıyla 0,0645 ve 0,0637 ng/mg protein'dir. Tedavi gruplarında ise IL-6 miktarı 6. saatte 0,202 ng/mg protein iken, 24. saatte 0,206 ng/mg protein'dir. Enfarktlı dokunun IL-6 yönünden 12/15 LOX inhibisyonuna verdiği yanıt modeller arasında farklılık göstermektedir. Buna göre iskemi/rekanalizasyon modelinde IL-6 miktarındaki artış ilk olarak 24. saatte saptanmıştır ($****p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). Kontrol grubunda 0,1843 ng/mg protein olarak ölçülen IL-6 miktarı, tedavi ile 0,0169 ng/mg protein seviyesine düşmüştür ($***p=0,0004$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.25).



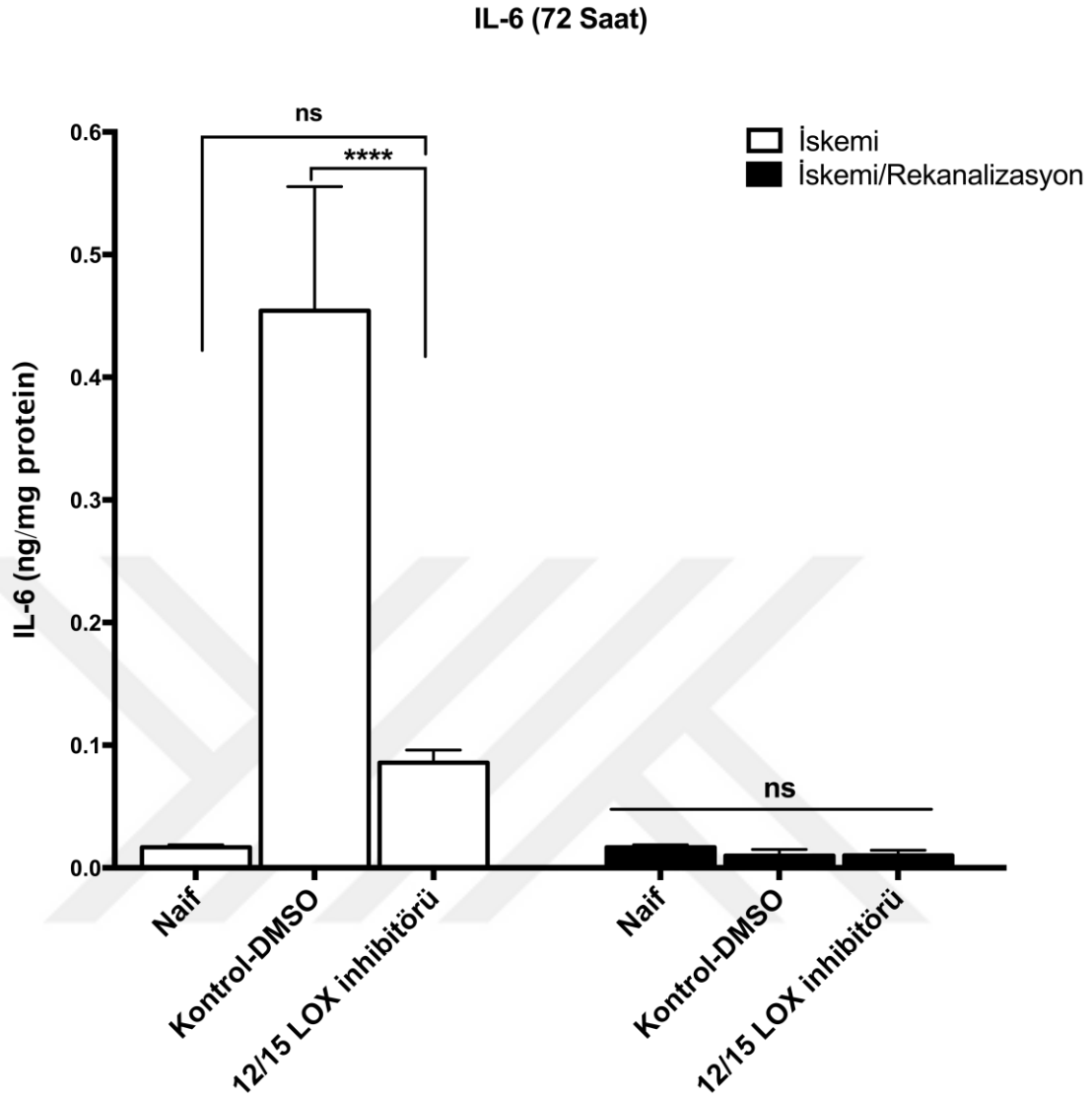
Şekil 4.25. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemiden 24 saat sonra beyin dokusunda IL-6 miktarı kontrol ve tedavi grubunda naif örneğe göre artmıştır. Tedavi grubunda saptanan artış istatistiksel olarak anlamlıdır (** $p=0,0002$; $n=3$ /grup). İ/R modelinde ise IL-6 miktarı kontrolde naif beyin örneğine göre yaklaşık 3 kat artmış (**** $p<0,0001$; $n=3$ /grup), 12/15 LOX inhibisyonu ile kontrole göre anlamlı oranda azalmıştır (** $p=0,0004$; $n=3$ /grup).

İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan beyin kesitlerinden kontrol grubuna ait örnekte IL-6 immünoaktivitesi azalmış ve sitoplazmaya toplanmıştır. 12/15 LOX inhibitörü verilmiş tedavi grubu örneğinde ise sitoplazmik ve difüz işaretlenmenin devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.26; sağ sütun). İskemi/rekanalizasyon kontrol grubu iskemi modelinin kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-6 sinyalinin azaldığı ve sitoplazmayla sınırlandığı, hücre çevrelerindeki çamurumsu sinyal nedeniyle hücre dışına salıverildiği düşünülmüştür. İskeminin 72. saatinde (subakut faz) IL-6 immünoaktivitesi ELISA sonucunu destekleyecek şekilde azalmıştır.



Şekil 4.26. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflamatuar sitokin olan IL-6 proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi kontrol (DMSO) grubu örneğinde, IL-6 immünohistokimyasal işaretlenmesinin belirgin olarak arttığı ve hücreye lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 37, sol sütun). Tedavi grubunda ise IL-6 immünoreaktivitesi hem kontrol hem de naif beyin örneğine göre artmıştır ve yer yer sitoplazmik işaretlenme dikkati çekmektedir (Şekil 35, sol sütun). İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan beyin kesitlerinden kontrol grubuna ait örnekte IL-6 immünoreaktivitesi azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur. 12/15 LOX inhibitörü verilmiş tedavi grubu örneğinde ise sitoplazmik ve difüz işaretlenmenin devam ettiği görülmektedir (Şekil 37; sağ sütun).

İskemi modeli uygulanan ve 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile incelenen IL-6 miktar analizinde kontrol grubunda IL-6 ifadesi geç dönemde artış göstermiştir (**** $p < 0,0001$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi grubunda ise IL-6 ifadesi kontrole göre 5,3 kat azalmıştır (**** $p < 0,0001$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.27). Böylece iskemi/rekanalizasyon modelinin 24. saatinde izlenen ifade profili ile benzerlik göstermiştir. Bu bulgu IL-6 ifadesinin iskemi ve iskemi/rekanalizasyon gibi farklı uyaranlara karşı farklı zaman noktalarında yanıt verdiğini göstermektedir. İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan grupta ise 72. saatte kontrol, tedavi ve naif gruplar arasında IL-6 miktarının değişmediği saptanmıştır ($p > 0,05$; $n=3/\text{grup}$). Bu bulgu bize iskemi/rekanalizasyon modelinde IL-6 cevabının iskemi modeline göre erken dönemde başlayıp, erken dönemde bittiğini düşündürmektedir (Şekil 4.27).

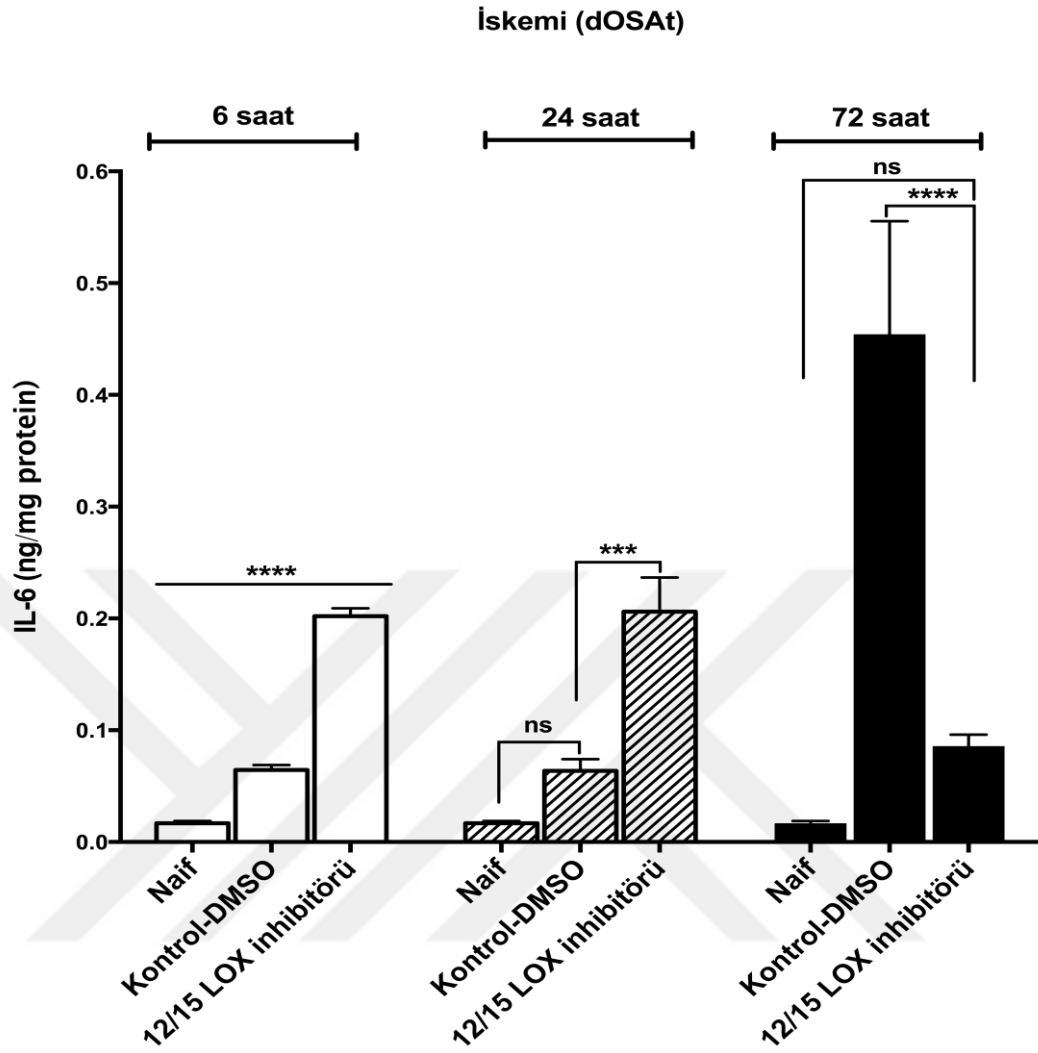


Şekil 4.27. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, IL-6 protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü enjekte edilmiştir (50 mg/kg, i.p.). Beyin dokusunda IL-6 miktarı iskemiden 72 saat sonra, yani geç dönemde artış göstermiştir (**** $p < 0,0001$; $n = 3$ /grup). Tedavi grubunda ise IL-6 ifadesi kontrole göre 5,3 kat azalmıştır (**** $p < 0,0001$; $n = 3$ /grup) (Şekil 4.27). İ/R modeli uygulanan grupta ise kontrol, tedavi ve naif gruplar arasında IL-6 miktarının değişmediği saptanmıştır ($p > 0,05$; $n = 3$ /grup). Bu bulgu bize iskemi/rekanalizasyon modelinde IL-6 cevabının iskemi modeline göre erken dönemde başlayıp, erken dönemde bittiğini göstermektedir (Şekil 4.27).

Kalıcı iskemi modeli uygulanan gruplar tüm zaman noktalarında karşılaştırıldıklarında, kontrol gruplarından 72 saat grubunda IL-6 seviyesinin anlamlı olarak yükseldiği, yani bu modelde hücresel IL-6 cevabının geç dönemde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.28). Yine 72 saat grubunda 12/15 LOX tedavisi

ile IL-6 seviyesi anlamlı olarak azalmıştır. Serebral iskemiden sonraki erken dönemde ise (6 ve 24 saat) tedavi verilen gruplarda IL-6 ifadesi kontrole göre artmıştır. Bunun nedeni kalıcı iske mi modelinde inflamasyonun erken dönemde tetiklenmemesi veya ELISA için alınan beyin bölgelerinin enfarkt alanı dışında kalan bölgeleri içermesi sonucu IL-6 miktarının beklenenden daha düşük miktarda saptanması olabilir. Oysa ki sadece enfarkt ve perienfarkt alandan alınan kesitlerin immünohistokimyasal incelemelerinde hem 6 hem de 24 saat örneklerinde kontrol gruplarında IL-6 immünoaktivitesinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır, dolayısı ile buradaki sinyal lokal doku yanıtını yansıtmaktadır. İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubu farelerin beyin dokularında IL-6 miktarı diğer zaman noktalarında ölçülen değerden yaklaşık 8 kat yüksek bulunmuştur. Tedavi inflamasyonun geç döneminde etki göstererek dokudaki IL-6 seviyesini naif gruba yaklaştırmıştır.

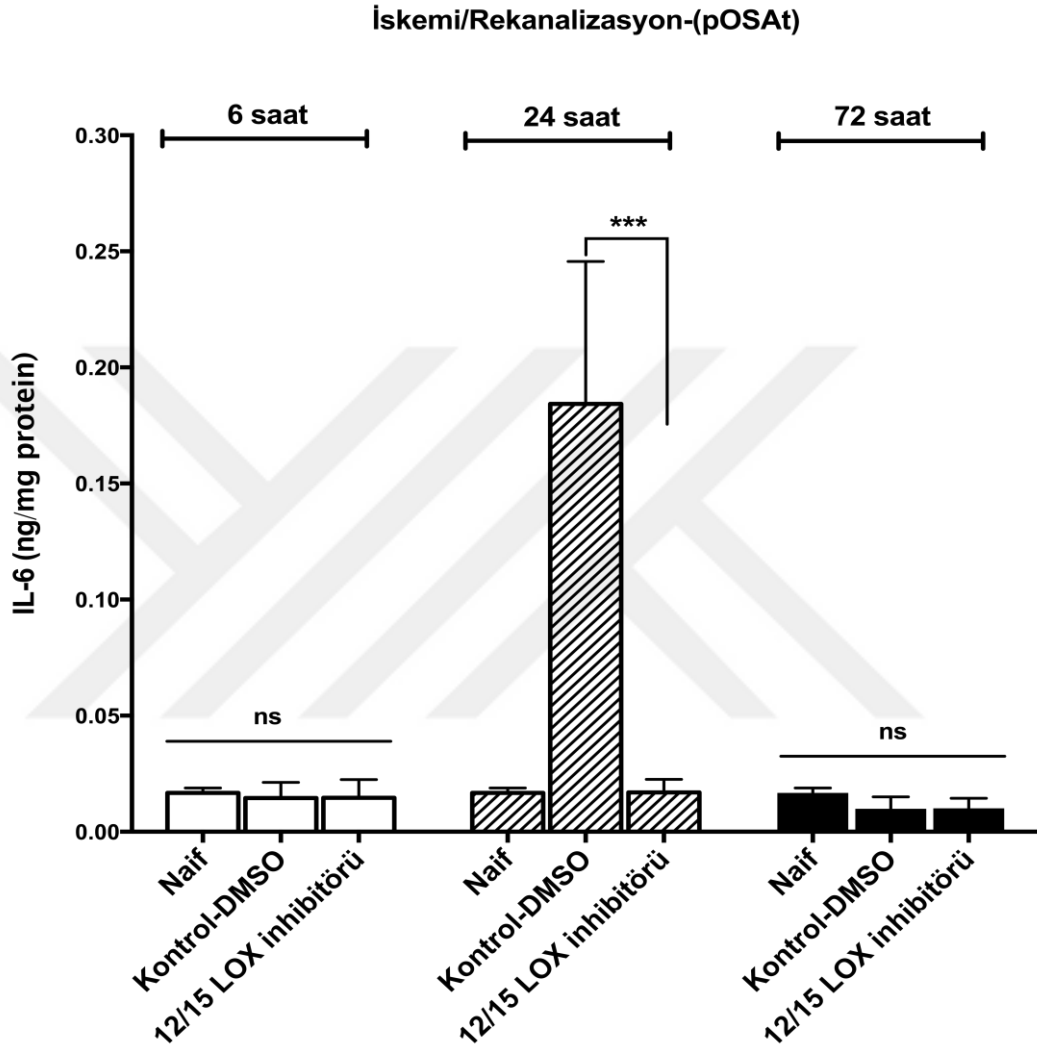
İske mi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-6 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. İskemiden 72 saat sonra kontrol grubu farelerin beyin dokusunda IL-6 seviyesinin anlamlı olarak yükseldiği, yani bu modelde hücre sel IL-6 cevabının geç dönemde gerçekleştiği görülmektedir. Yine 72 saat grubunda 12/15 LOX tedavisi ile IL-6 seviyesi anlamlı olarak azalmıştır. Serebral iskemiden sonraki erken dönemde ise (6 ve 24 saat) tedavi verilen gruplarda IL-6 ifadesi kontrole göre artmıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). Bu bulgu IL-6'nın kontrol gruplarında artmayıp, tedavi ile indüklenmesi, inflamasyon sürecinin akut döneminde koruyucu rol üstlenmiş olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.28. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-6 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. İskemiden 72 saat sonra kontrol grubu farelerin beyin dokusunda IL-6 seviyesinin anlamlı olarak yükseldiği, yani bu modelde hücrel IL-6 cevabının geç dönemde gerçekleştiği görülmektedir. Yine 72 saat grubunda 12/15 LOX tedavisi ile IL-6 seviyesi anlamlı olarak azalmıştır. Serebral iskemiden sonraki erken dönemde ise (6 ve 24 saat) tedavi verilen gruplarda IL-6 ifadesi kontrole göre artmıştır ($p > 0,05$; $n=3/\text{grup}$).

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan grupların 6, 24 ve 72. saat IL-6 ifade sonuçları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.29). Buna göre iskemiden 6 ve 72 saat sonra IL-6 seviyesi kontrol gruplarında indüklenmeyip, iskemiden 24 saat sonra indüklenmiştir. Tedavi ile IL-6 seviyesi naif doku seviyesine yaklaşmıştır. Bu bulguyu kliniğe uyarlamaya çalışırsak, inflamasyonun erken dönemde (24 saat) aktive olduğu göz önünde bulundurularak İ/R hasta gruplarında 12/15 LOX

inhibitörü tPA ile birlikte veya tek başına akut dönemde veya tekrarlanan dozlarda verilerek iskemi/rekanalizasyon sonrası ortaya çıkan inflamasyonun baskılanmasını sağlayabilir.



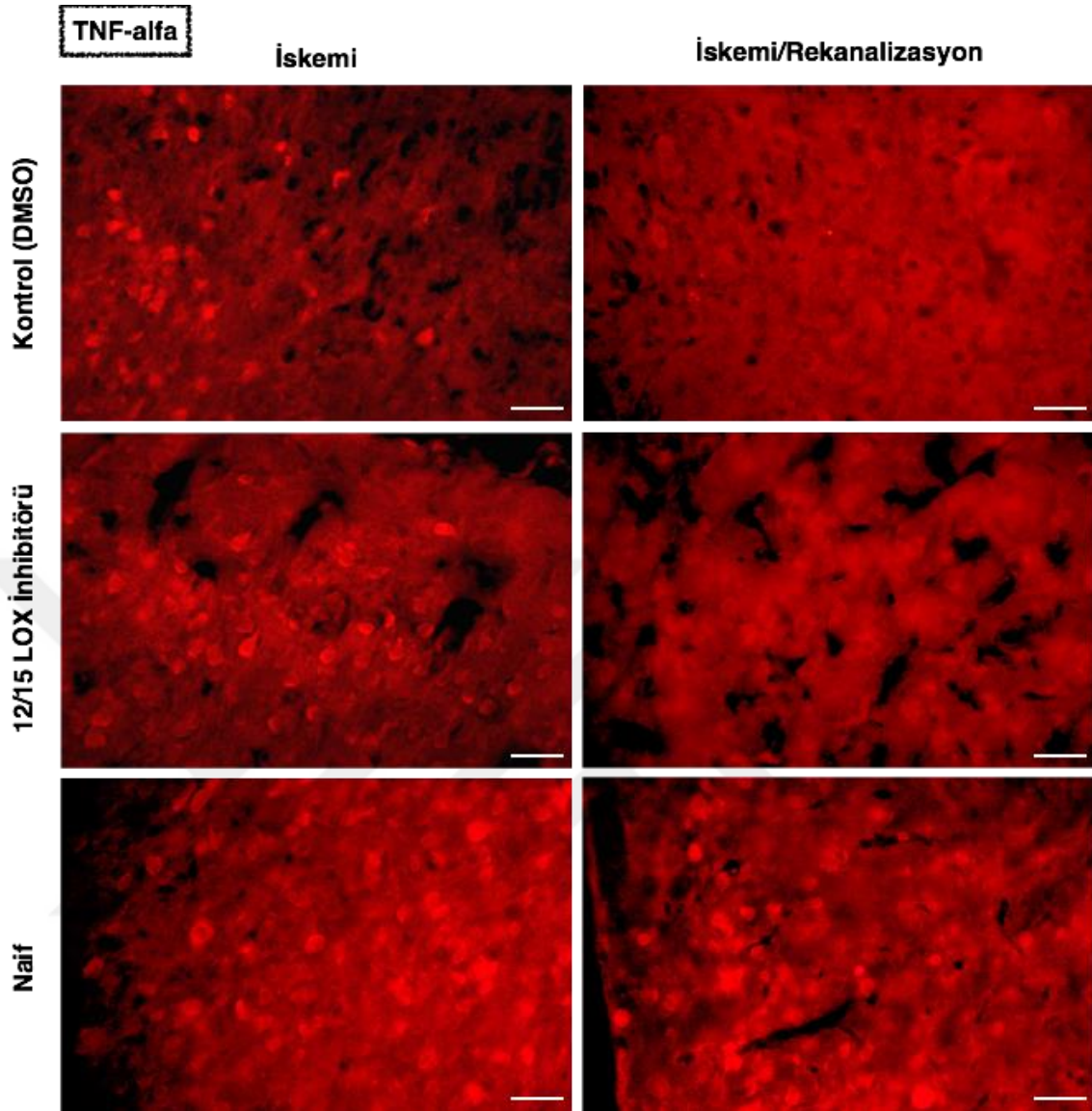
Şekil 4.29. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-6 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. Buna göre iskemiden 6 ve 72 saat sonra IL-6 seviyesi kontrol gruplarında indüklenmeyip, iskemiden 24 saat sonra indüklenmiştir. İskemiden 1 saat sonra enjekte edilen 12/15 LOX inhibitörü ile inflamasyonun subakut döneminde artmış olan IL-6 miktarı naif doku seviyesine yaklaşmış, baskılanmıştır.

4.6. Serebral İskemi Sonrası Proinflamatuvar TNF-alfa Sitokin Yanıtının İncelenmesi

TNF-alfa beyin ve sistemik dolaşımında üretilen bir sitokindir. Makrofaj, mikrogliya ve nöronlarda üretildiği bilinmektedir (110). TNF-alfa akut inflamatuvar cevabın önemli bir parçasıdır ve serebral iskemide hasarı artırdığı bildirilmiştir (111). İnme hastalarında da hem serum hem de beyin omurilik sıvısında TNF-alfa seviyesindeki artışın lezyon büyüklüğü ile orantılı olduğu saptanmıştır (112).

Bu tez çalışmasında serebral iskeminin tetiklediği nöroinflamasyonda TNF-alfa'nın, iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda ve farklı zaman noktalarında (6, 24, 72 saat) elde edilen fare beyin kesitlerindeki immünoaktivitesi immünohistokimya yöntemi ile, kantitatif değişimi ise ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Naif beyin kesitinde TNF-alfa sinyalinin hücresel yer yer sitoplazmik ve hücre uzantılarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.30). İskemi modeli oluşturulmuş ve 6 saat sonra sakrifiye edilmiş fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesinin hücresel ve hücre uzantılarında olduğu görülmektedir. Tedavi grubunda kontrol ve naif gruba kıyasla işaretlenme şekli değişmiştir. Enfarktı çevreleyen dokuda TNF-alfa sinyalinin sitoplazmik olduğu ve kontrol grubunda gözlenen hücre uzantılarındaki işaretlemenin arttığı görülmektedir (Şekil 4.30; sol sütun). Hücre ve uzantılarının şekillerinden bunların nöron ve nörona ait uzantılar (akson veya dendrit) olduğu düşünülebilir.

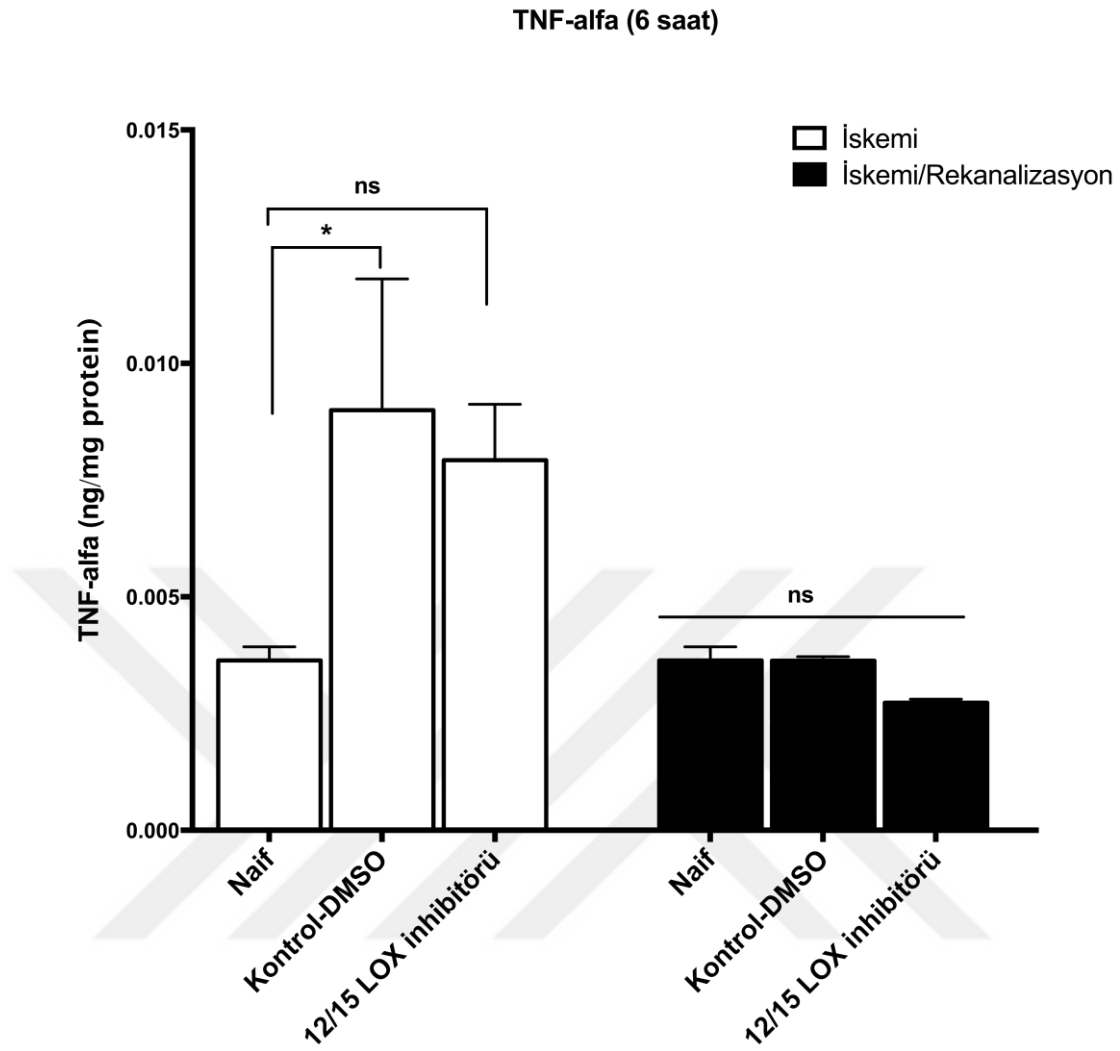
İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan ve DMSO verilen kontrol grubu örneğinde ise TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlemesi peri-enfarkt alanda sitoplazmik ve difüz bir şekil izlemektedir (Şekil 4.30; sağ sütun). TNF-alfa bu erken dönemde hücrelerden salınmış izlenimi vermektedir. 12/15 LOX inhibitörü (ML351) verilmiş tedavi grubu fare beyin kesitinde sitoplazmik işaretlenmenin kontrole göre artarak, naif gruba benzer işaretlenme şekli izlediği görülmektedir (Şekil 4.30; sağ sütun). Ancak iki modelde de kontrol grunda TNF-alfa ifadesinin naif gruba kıyasla artmaması, bu sitokinin uyarının 6. saatinde aktive olmadığını veya hücrelerden salındığını düşündürmektedir.



Şekil 4.30. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde, proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Naif beyin kesitinde TNF-alfa sinyalinin hücreyel yer yer sitoplazmik ve hücre uzantılarında olduğu görülmektedir (en alt satır). İskemi modeli oluşturulmuş ve DMSO enjekte edilmiş olan kontrol grubu örneğinde, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesinin hücreyel ve hücre uzantılarında olduğu saptanmıştır. Tedavi grubunda TNF-alfa sinyalinin sitoplazmik olduğu ve kontrol grubunda gözlenen hücre uzantılarındaki işaretlemenin arttığı görülmektedir (Şekil 39; sol sütun). İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan ve DMSO verilen kontrol grubu örneğinde ise TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlemesi peri-enfarkt alanda sitoplazmik ve difüz bir şekil izlemektedir (sağ sütun). Tedavi grubu kesitinde sitoplazmik işaretlenmenin kontrole göre artarak, naif gruba benzer işaretlenme şekli izlediği görülmektedir.

İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile incelenen TNF-alfa ifade analizinde naif gruba göre kontrol ve tedavi gruplarında artış saptanmıştır. Naif gruba göre kontrol grubunda belirlenen TNF-alfa artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p=0,0286$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.31). Tedavi grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma eğilimi vardır.

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında ise gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.31). Bu bulgu iskemi modelinden 6 saat sonra ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın TNF-alfa ifadesini artırırken, iskemi/rekanalizasyon modeli ile indüklenen inflamatuvar yanıtı TNF-alfa'nın erken dönemde katılmadığını düşündürmektedir.



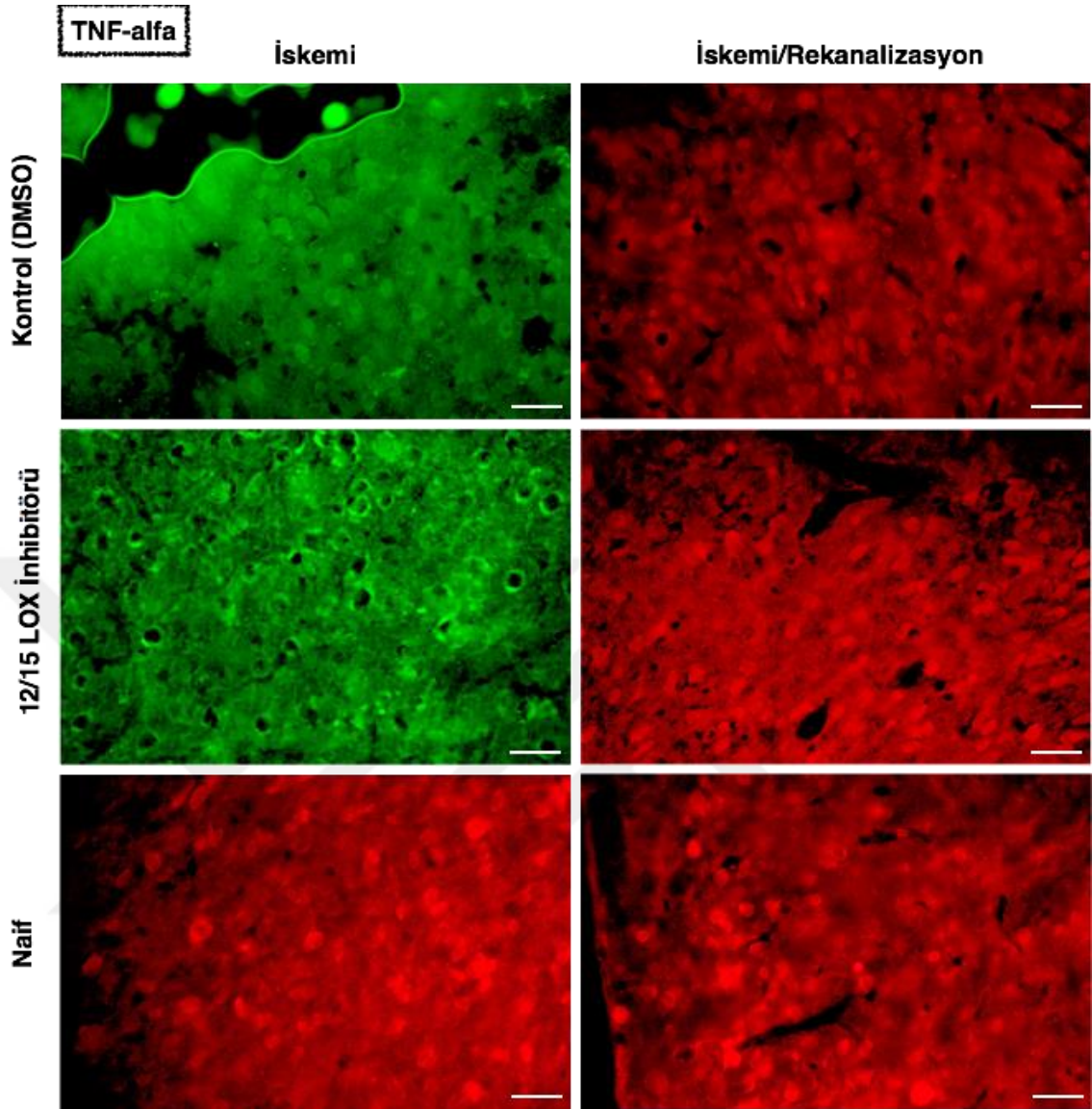
Şekil 4.31. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü enjekte edilmiştir (50 mg/kg, i.p.). İskemi modelinde TNF-alfa miktarının naif gruba göre kontrol ve tedavi gruplarında arttığı saptanmıştır. Kontrol grubunda belirlenen TNF-alfa artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p=0,0286$; $n=3$ /grup). İ/R modeli uygulandıktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında kontrole göre tedavi grubunda azalma eğilimi gösterse de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$; $n=3$ /grup). Bu bulgu farklı uyaranlara TNF-alfa cevabının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

İskemi modeli uygulanan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesi hücresel ve sitoplazmik işaretlenme şekli izleyerek, naif gruba benzediği görülmektedir. Tedavi grubunda kontrol ve naif gruba kıyasla işaretlenme şekli değişmiştir. Enfarktı çevreleyen dokuda TNF-alfa sinyalinin sitoplazmik ve

hücrelerarası sıvanma şeklinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.32, sol sütun). Yani TNF-alfa iskemiden 24 saat sonra tedavi grubunda hücreden salınmıştır.

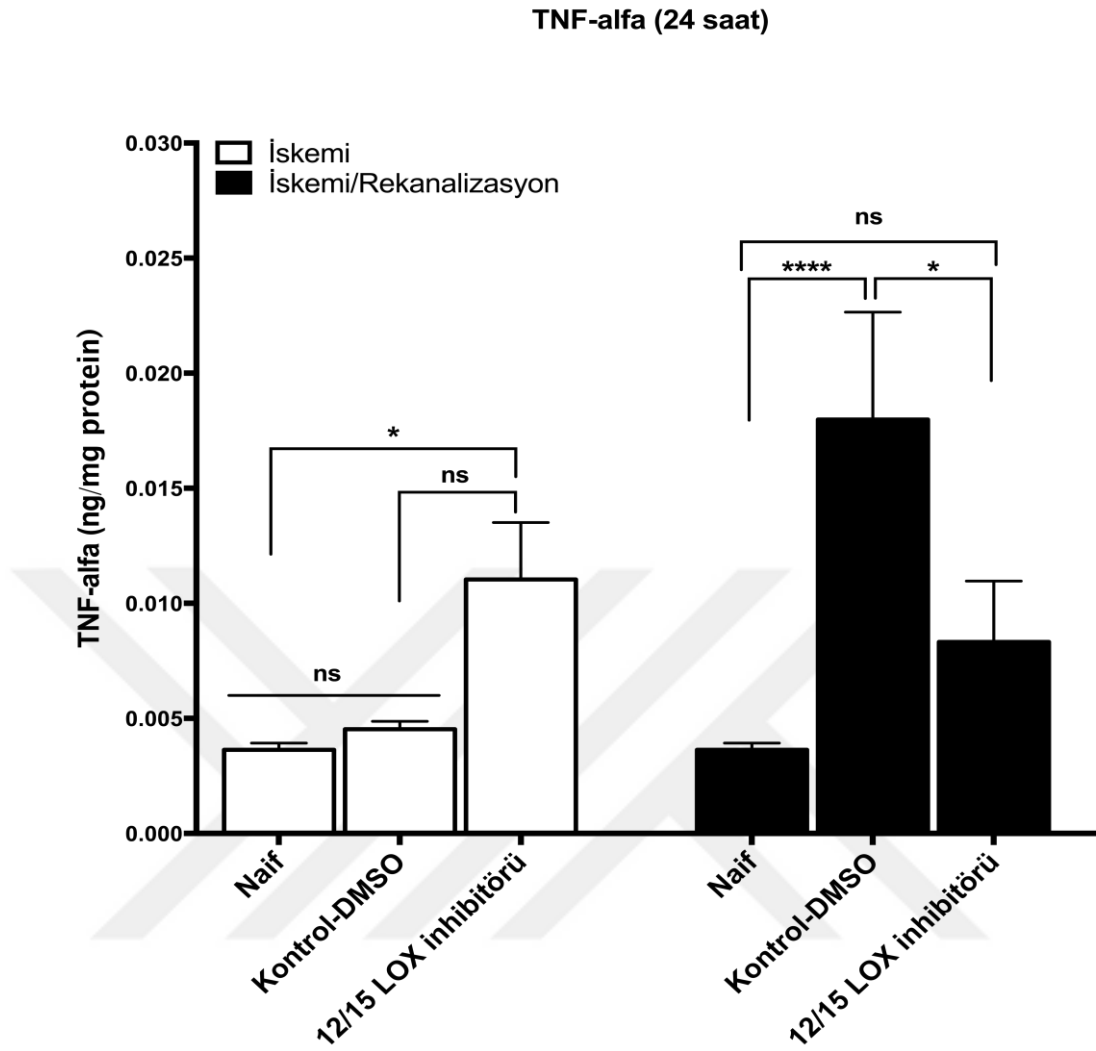
İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan ve DMSO verilen kontrol grubunda ise TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesi peri-enfarkt alanda artmış ve hem hücresel hem de sitoplazmik bir işaretlenme şekli izlemektedir (Şekil 4.32; sağ sütun). 12/15 LOX inhibitörü (ML351) verilmiş tedavi grubu örneğinde kontrol grubunda görülen sitoplazmik işaretlenmenin yerini tamamen hücresel işaretlenme almıştır ve sinyal şiddeti artmıştır (Şekil 4.32; sağ sütun). İ/R modeli uygulanan kontrol ve tedavi gruplarında 6. saatte salıverilmiş olan TNF-alfanın 24. saatte yeniden sentezlenerek hücreleri tekrar doldurduğu söylenebilir.





Şekil 4.32. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi modeli uygulanan ve fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) gruba ait örnekte, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesi hücresel ve sitoplazmik işaretlenme şekli izleyerek, naif gruba benzediği görülmektedir. Tedavi grubunda TNF-alfa sinyalinin sitoplazmik ve hücrelerarası sıvanma şeklinde olduğu görülmektedir (sol sütun). İskemi/rekanalizasyon modeli yapılan ve DMSO verilen kontrol grubunda ise TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesi artmış ve hem hücresel hem de sitoplazmik işaretlenme izlenmektedir (sağ sütun). Tedavi grubu örneğinde ise kontrol grubunda görülen sitoplazmik işaretlenmenin yerini tamamen hücresel işaretlenme almıştır ve sinyal şiddeti artmıştır.

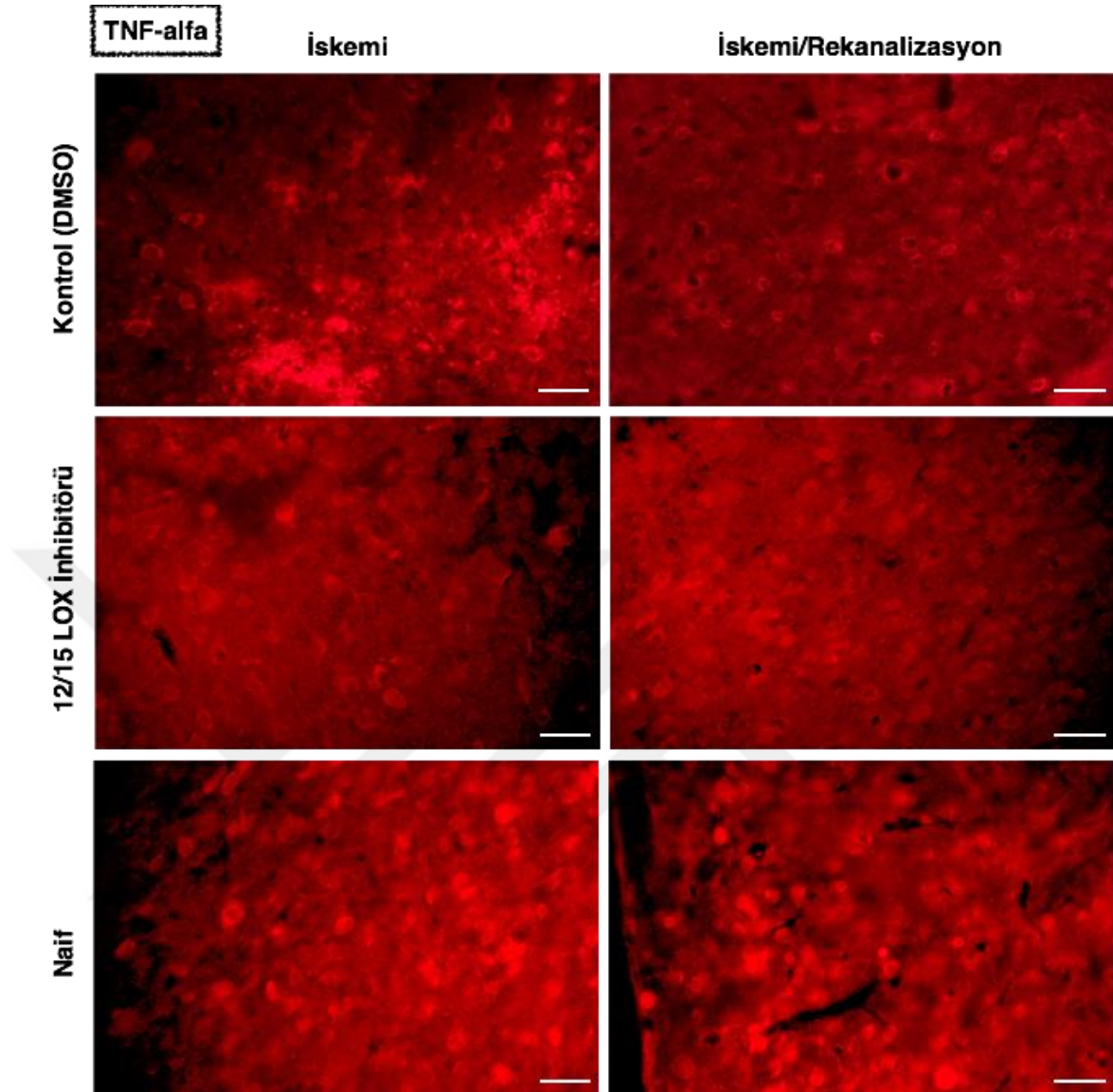
İskemi modeli uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında TNF-alfa miktarları ölçülmüştür. Buna göre kontrol grubunda TNF-alfa miktarı değişmezken, tedavi grubunda TNF-alfa miktarı anlamlı oranda artış göstermiştir ($p=0,023$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.33). Ölçüm için alınan beyin örneğinin büyük olması, TNF-alfa ifadesinin kontrol grubunda olması gerekenden daha düşük konsantrasyonda olmasını açıklayabilir. Çünkü ELISA sonucu, immünohistokimyasal doku analizi ile elde edilen enfarkt çevresindeki hücrelerin gösterdiği artışı yansıtmamıştır. Oysa ki iskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 1 saat sonra DMSO enjekte edilen kontrol grubu farelerin beyin dokularında TNF-alfa miktarı naif gruba göre 5 kat artmıştır ($****p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi ile TNF-alfa miktarı kontrole göre 2,25 kat azalarak ($*p=0,0148$; $n=3/\text{grup}$), naif grupta ölçülen TNF-alfa miktarına yaklaşmıştır (Şekil 4.33). İskemi/rekanalizasyon grubunda enfarktın büyük olması ve ELISA için alınan örneğin sadece bu bölgeyi içermesi nedeniyle iki model arasında farklı sonuçlar elde edildiği düşünülmüştür.



Şekil 4.33. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü enjekte edilmiştir (50 mg/kg, i.p.). İskemi modeli kontrol grubunda TNF-alfa miktarı değişmezken, tedavi grubunda TNF-alfa miktarı anlamlı oranda artış göstermiştir ($p=0,023$; $n=3/\text{grup}$). TNF-alfa ifadesinin kontrol grubunda düşük konsantrasyonda olması, ölçüm için alınan beyin doku örneğinin enfarkt sınırlarını aşmasından kaynaklanabilir. İ/R modeli oluşturulmuş kontrol grubu farelerin beyin dokularında TNF-alfa miktarı naif gruba göre 5 kat artmıştır (**** $p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi ile TNF-alfa miktarı kontrole göre 2,25 kat azalarak (* $p=0,0148$; $n=3/\text{grup}$), naif grupta ölçülen TNF-alfa miktarına yaklaşımıştır.

İskemi modeli uygulandıktan 72 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesinin azaldığı ve sitoplazmaya lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 4.34, sol sütun). Tedavi grubunda da sinyalin naif örneğe göre azaldığı ve sitoplazmik işaretlenmenin olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4.34, sol sütun).

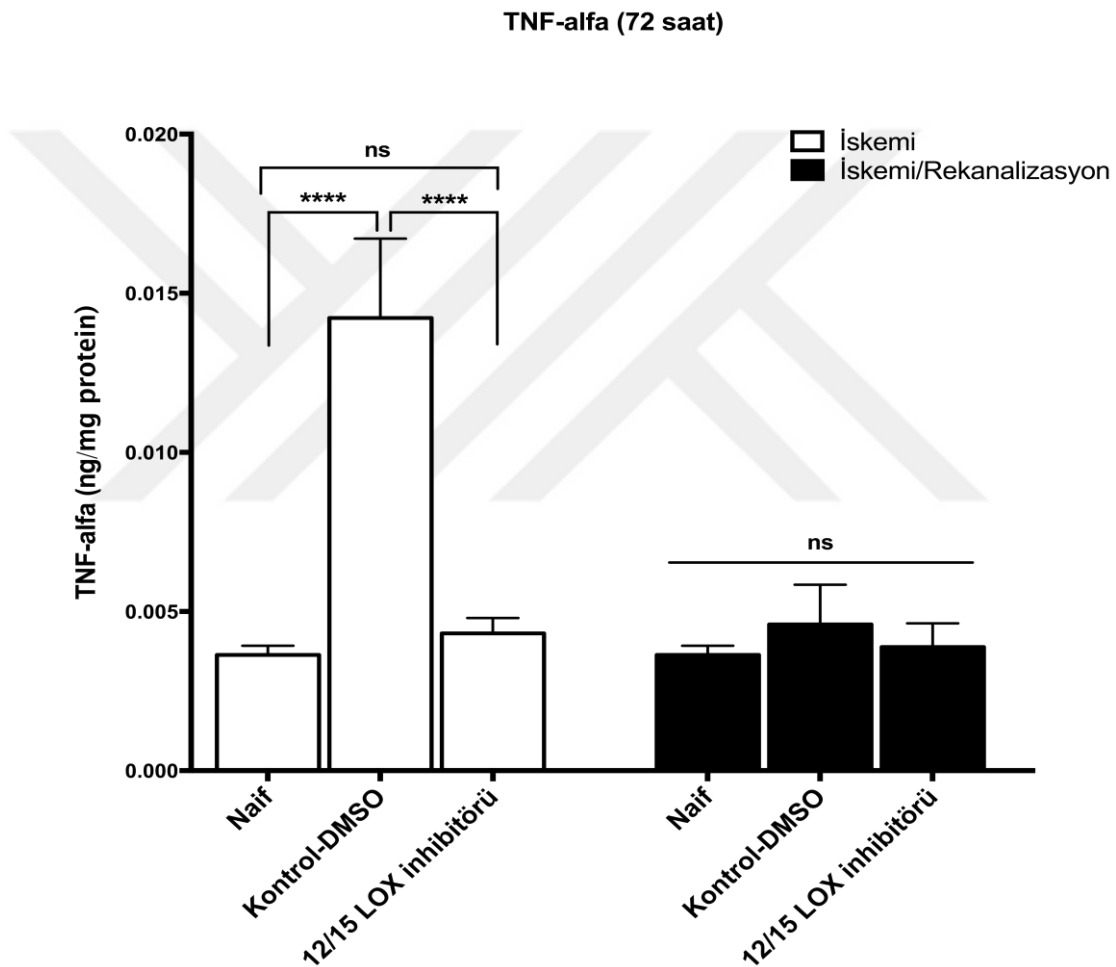
İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan ve 72 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesi azalmış ve sitoplazmik bir şekilde sinyal izlenmektedir (Şekil 4.34; sağ sütun). 12/15 LOX inhibitörü (ML351) verilen tedavi grubu örneğinde kontrol kesitinde görülen sitoplazmik işaretlenmenin yerini hücresel ve yer yer sitoplazmik işaretlenme almıştır (Şekil 4.34; sağ sütun). Her iki modelin tedavi grubunda da TNF-alfa işaretleme şeklinin peri-enfarkt alanda naif kesite benzediği söylenebilir. İki modelde de kontrol grubunda TNF-alfa immünoreaktivitesi naif kesite göre değişmiş, hücrede sitoplazmaya lokalize olmuş ve/veya hücreden salınmıştır.



Şekil 4.34. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TNF-alfa proteininin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi modeli uygulanan ve DMSO verilen kontrol grubu örneğinde, TNF-alfa immünohistokimyasal işaretlenmesinin azaldığı ve sitoplazmaya lokalize olduğu görülmektedir (sol sütun). Tedavi grubunda ise sinyalin naif örneğe göre azaldığı ve sitoplazmik işaretlenmenin olduğu dikkati çekmektedir (sol sütun).

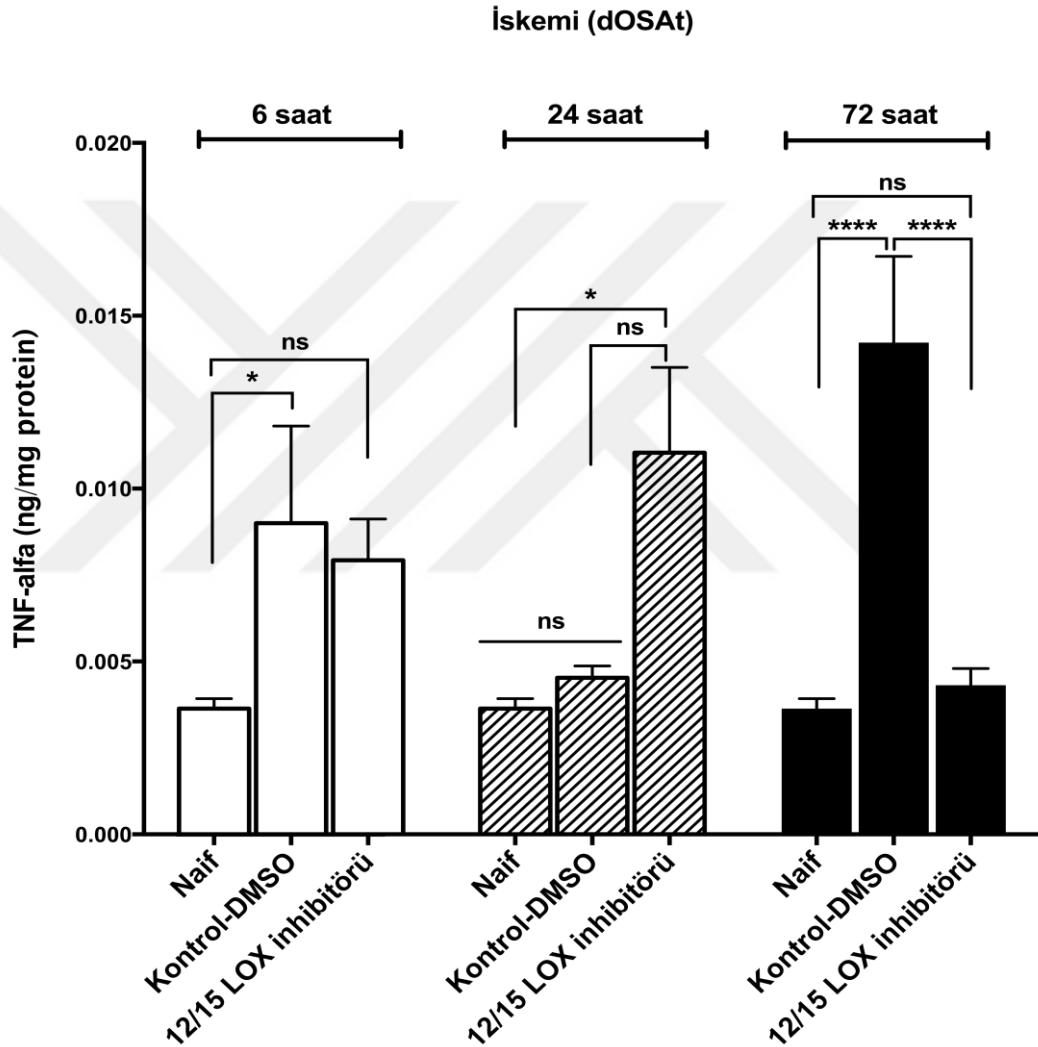
İskemi modeli uygulandıktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında ölçülen TNF-alfa miktarı kontrol grubunda naif örneğe göre 2,5 kat artmıştır (**** $p < 0,0001$; $n=3$ /grup). 12/15 LOX inhibitörünün verildiği tedavi grubunda TNF-alfa miktarı kontrole göre 3,5 kat azalma göstererek (**** $p < 0,0001$; $n=3$ /grup), naif gruba yaklaşmıştır ($p > 0.05$; $n=3$ /grup) (Şekil 4.35).

İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra TNF-alfa miktarı gruplar arasında farklılık göstermemiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.35). Elde edilen verilere göre iskemi modelinde TNF-alfa geç dönemde aktive olurken, iskemi/rekanalizasyon modelinde erken dönemde aktive olmuştur. Geç dönemde ise ifadesi azalarak, normal beyin dokusunda ölçülen TNF-alfa seviyesine gerilemiştir. Buradan TNF-alfa'nın iki farklı model ile indüklenen inflamasyon sürecinin farklı zaman noktalarında uyarıldığını düşündürmektedir.



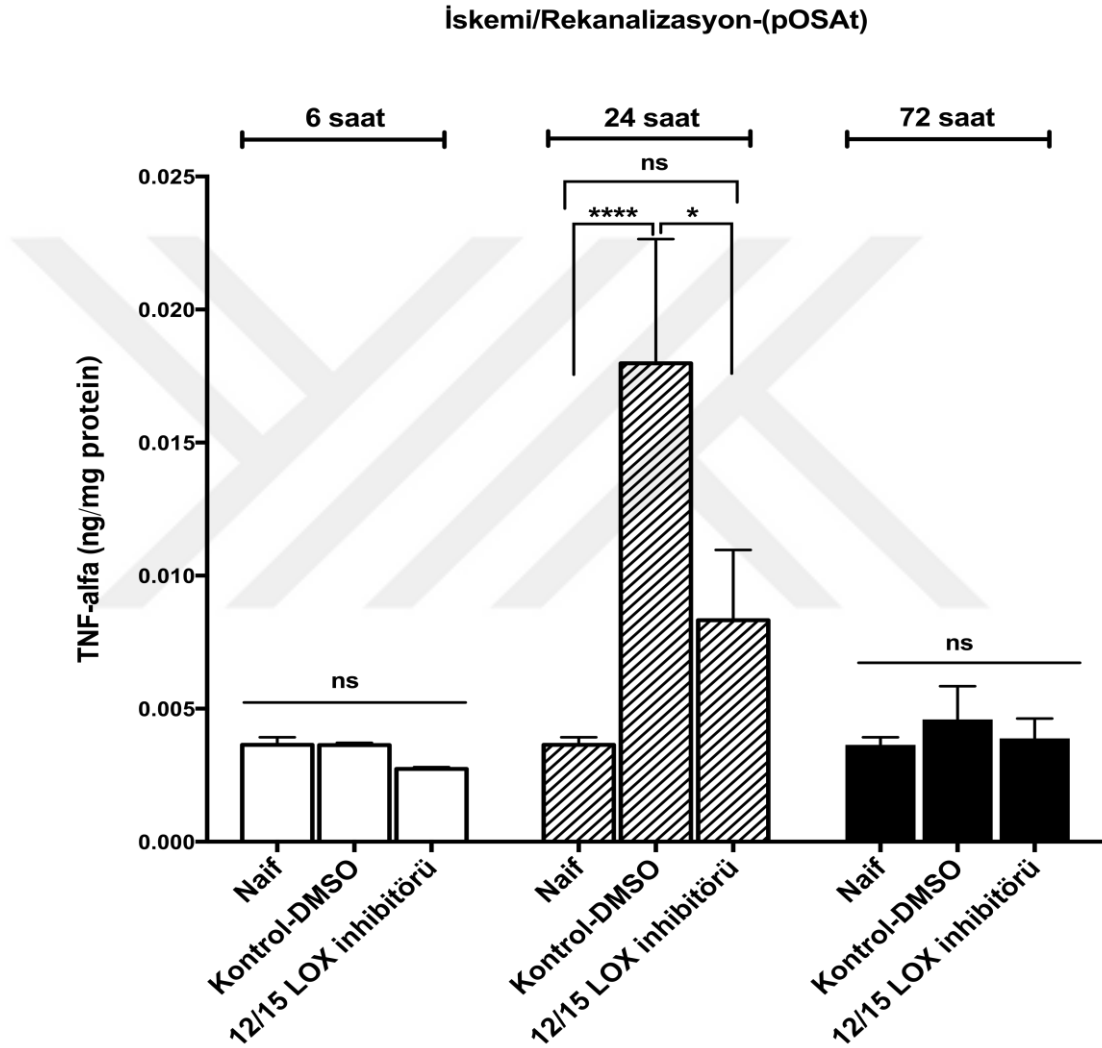
Şekil 4.35. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, TNF-alfa protein miktarının (ng/mg protein) ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modeli kontrol grubunda TNF-alfa miktarı naif örneğe göre 2,5 kat artmıştır (**** $p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). 12/15 LOX inhibitörünün verildiği tedavi grubunda ise kontrole göre 3,5 kat azalma göstererek (**** $p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$), naif gruba yaklaşmıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). İ/R modelinde TNF-alfa miktarı gruplar arasında farklılık göstermemiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$).

İskemi modeli uygulanan grupların ELISA yöntemi ile saptanan 6, 24 ve 72. saat TNF-alfa ifade sonuçları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.36). Buna göre iskemiden sonraki erken ve geç dönemde (6 ve 72 saat) kontrol gruplarında TNF-alfa ifadesi naif beyin örneğine göre anlamlı olarak artmış, ancak sadece 72 saat grubunda 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi örneklerinde bu artış anlamlı olarak baskılanmıştır.



Şekil 4.36. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. İskemiden 6 ve 24 saat sonra kontrol ve tedavi grupları naif beyin örneğine göre anlamlı değişiklik göstermemiştir ($p > 0,05$; $n = 3/\text{grup}$). Ancak iskemiden 72 saat sonra 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi örneklerinde TNF-alfa ifadesi kontrol örneklerine göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$; $n = 3/\text{grup}$).

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan grupların ELISA yöntemi ile saptanan 6, 24 ve 72. saat TNF-alfa ifade miktarları istatistiksel anlamlılık bakımından karşılaştırılmıştır (Şekil 4.37). Buna göre İ/R modelinde 6 ve 72 saatte gruplar arasında bir değişiklik saptanmazken, 24 saat kontrol grubunda anlamlı bir artış ve bunun tedavi ile baskılandığı görülmüştür.



Şekil 4.37. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında TNF-alfa sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. İskemiden sonra 6 ve 72 saat gruplarında TNF-alfa ifadesi naif, kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı değişiklik göstermemiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). 24 saat grubunda ise kontrolde anlamlı olarak artan TNF-alfa miktarı tedavi ile baskılanmıştır.

İskemi ve iskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan farelerin beyin dokusunda yapılan immünohistokimyasal TNF-alfa incelemelerinde, TNF-alfanın hücrenin

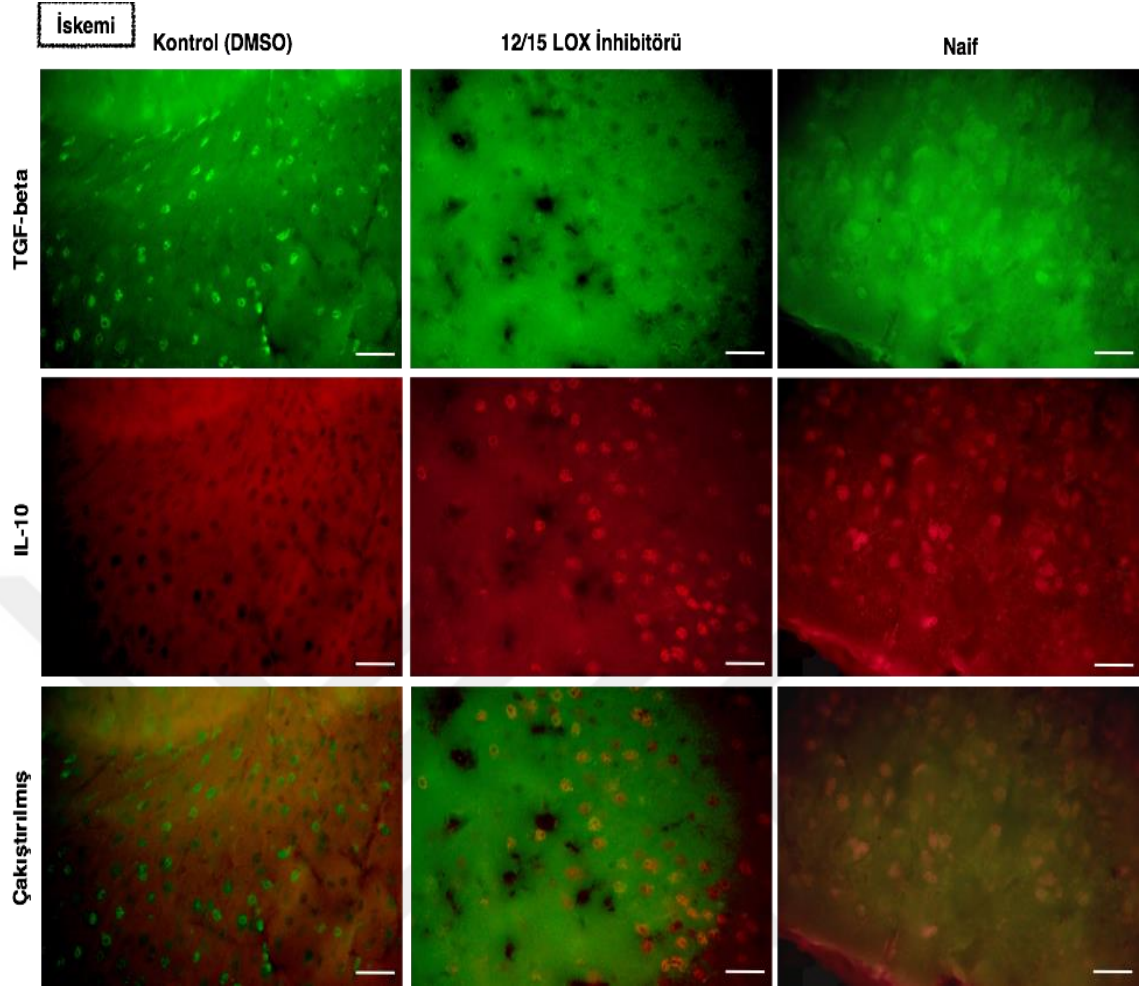
sitoplazmasına lokalize olduğu ve yer yer hücreden salındığı saptanmıştır. Dolayısı ile TNF-alfa indüklenmesi olmakla birlikte kontrol ve tedavi grupları arasında belirgin fark görülmemiştir. ELISA yöntemi ile yapılan kantitatif incelemede ise TNF-alfanın serebral iskeminin çok erken (6 saat) ve geç döneminde (72 saat) indüklendiği ve tedavi ile bu artışın baskılandığı sonucuna varılmıştır. İ/R modeli uygulanan grupta ise 24 saatte TNF-alfa indüklenmesinin olduğu ve bunun tedavi ile azaldığı görülmüştür. ELISA ve immünohistokimyasal incelemeler ile elde edilen sonuçların arasında gözlenen değişiklikler, analizlerde kullanılan dokunun daha büyük olmasına ve kesitlerde incelenen doku alanlarının sadece enfarkt ve perienfarkt alanı kapsamına bağlı olabilir.

4.7. Serebral İskemi Sonrası Anti-inflamatuvar TGF-beta ve IL-10 Sitokin Yanıtının İncelenmesi

Aktive mikrogliya ve astrositlerden hem pro- hem de anti-inflamatuvar sitokin salınımı olur. Anti-inflamatuvar sitokinlerden TGF-beta ve IL-10 bunlardan bazılarıdır. Lipopolisakkarit ile inflamasyonun indüklendiği bir çalışmada aktive mikrogliadan IL-10 salıverildiği ve astrosit üzerindeki reseptörüne bağlanıp TGF-beta ifadesini artırdığı, ardından TGF-betanin salınıp mikrogliada proinflamatuvar sitokin (IL-1beta, IL-6) üretimini azalttığı belirtilmiştir (113). Yani IL-10 ve TGF-beta doku hasarında birbirleriyle etkileşerek inflamasyonu baskılayıcı yönde etki etmektedir. TGF-beta çok fonksiyonlu bir sitokindir ve dönüştürücü büyüme faktörü ailesi üyesidir. İnme geçiren hastalarda enfarkt ve perienfarkt alanda TGF-beta immünoaktivitesinin arttığı saptandıktan sonra serebral iskemi çalışmalarında bu sitokine olan ilgi artmıştır (114). TGF-betanin iskemi sonrası nöronal apoptozu önleyerek ve anti-inflamatuvar yanıtı indükleyerek koruyucu etki gösterdiği çalışmalar yapılmıştır. Bu etkinin ortaya çıkmasında astrositlerin rolü olduğu bilinmektedir (115). TGF-beta pro formunda bulunur ve bir uyarı ile aktifleştğinde hücreden salınarak glial hücre veya nöron üzerindeki reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir.

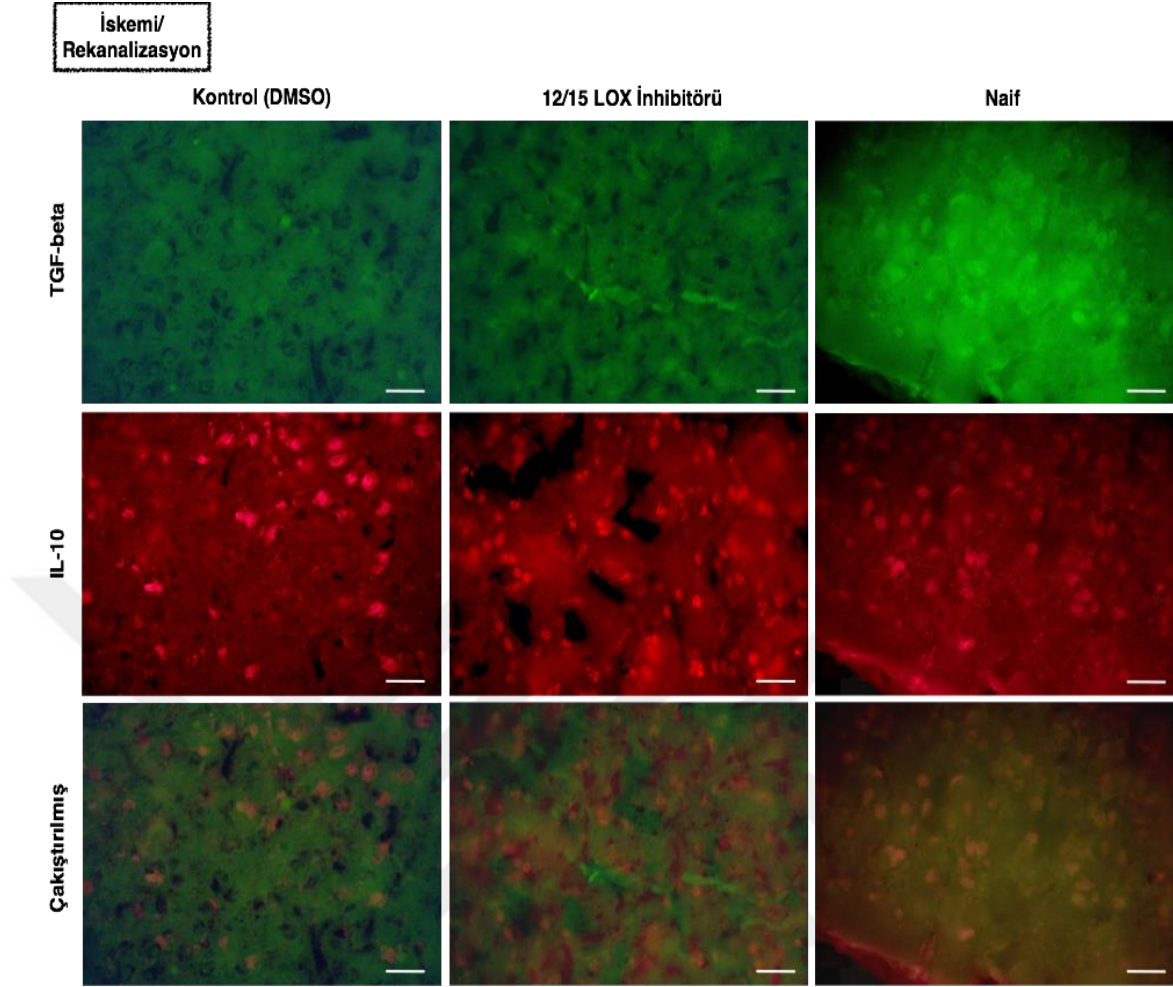
Bu tez çalışmasında serebral iskeminin tetiklediği nöroinflamasyonda anti-inflamatuvar sitokinlerden TGF-beta ve IL-10'un, iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda ve farklı zaman noktalarında (6, 24, 72 saat) elde edilen fare beyin

kesitlerindeki immünoaktivitesi immünohistokimya yöntemi ile ve kantitatif değişimi ise ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Naif beyin kesitinde TGF-beta ve IL-10 sinyalinin hücreyel olduğu görülmektedir (Şekil 4.38, sağ sütun). İskemi modeli oluşturulmuş ve 6 saat sonra sakrifiye edilmiş fare beyin kesitlerinden kontrol (DMSO) grubunda, TGF-beta immünolojik işaretlenmesinin sitoplazmaya lokalize olduğu izlenmektedir (Şekil 4.38, sol sütun). Buna karşılık IL-10 sinyalinin alınmadığı dikkati çekmektedir. En alt satırda TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmış ve TGF-beta sinyalinin olduğu hücrelerde IL-10 sinyalinin olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni IL-10'un tamamen hücreden salınması olabilir. Tedavi grubunda ise kontrole göre farklı bir görünüm saptanmıştır. Şöyle ki TGF-beta sinyali genel olarak azalmış ve kaldığı birkaç hücrede ise sitoplazmik yerleşim gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.38, orta sütun). IL-10 sinyali ise kontrolde tamamen kaybolurken, tedavi grubunda hücreyel ve yer yer sitoplazmik olacak şekilde korunmuştur (Şekil 4.38, orta sütun). 6 saat iskeminin ardından tedavi grubunda TGF-beta olmamıştır. IL-10 açısından kontrolde kaybolan sinyal tedavi grubunda artarak naif gruba benzemiştir. Buna göre 12/15 LOX inhibisyonu 6 saat iskemi modelinde TGF-beta üzerinde etkili olmaz iken, IL-10 işaretlenmesinde artışa yol açmıştır.



Şekil 4.38. İskemi modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 proteinlerine ait görüntüler üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 µm). Naif beyin kesitinde TGF-beta ve IL-10 sinyalinin hücresel olduğu görülmektedir (sağ sütun). Kontrol (DMSO) grubuna ait örnekte TGF-beta immünohistokimyasal işaretlenmesinin sitoplazmaya lokalize olduğu izlenmektedir (sol sütun). Buna karşılık IL-10 sinyalinin alınmadığı dikkati çekmektedir. Tedavi grubunda TGF-beta sinyali genel olarak azalmış ve kaldığı birkaç hücrede ise sitoplazmik yerleşim göstermiştir (orta sütun). IL-10 sinyali ise kontrolde tamamen kaybolurken, tedavi grubunda hücresel ve yer yer sitoplazmik olacak şekilde korunmuştur (orta sütun).

İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubu fare beyin dokularında, TGF-beta sinyali azalmış hücre çekirdeğine lokalize olmuştur (Şekil 4.39, sol sütun). Aynı dokuda IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü yüksektir. Sol sütunun en alt satırında karşılaştırılmış resimde TGF-beta ve IL-10 işaretlenme şeklinin farklı olmasına rağmen aynı hücrelerde ifade edildiği düşünülmüştür. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (Şekil 4.39, orta sütun). IL-10 işaretlenmesi hem hücresel yerleşim hem de sinyal gücü bakımından naif gruba benzemektedir (Şekil 4.39, orta sütun). Serebral iskemi/rekanalizasyon modelinde 6. saatte TGF-beta sinyali hem kontrol hem tedavi grubunda baskılanırken, IL-10 kontrolde azalmış, tedavi grubunda ise kontrole göre artarak naif beyin örneğine yaklaşmıştır.

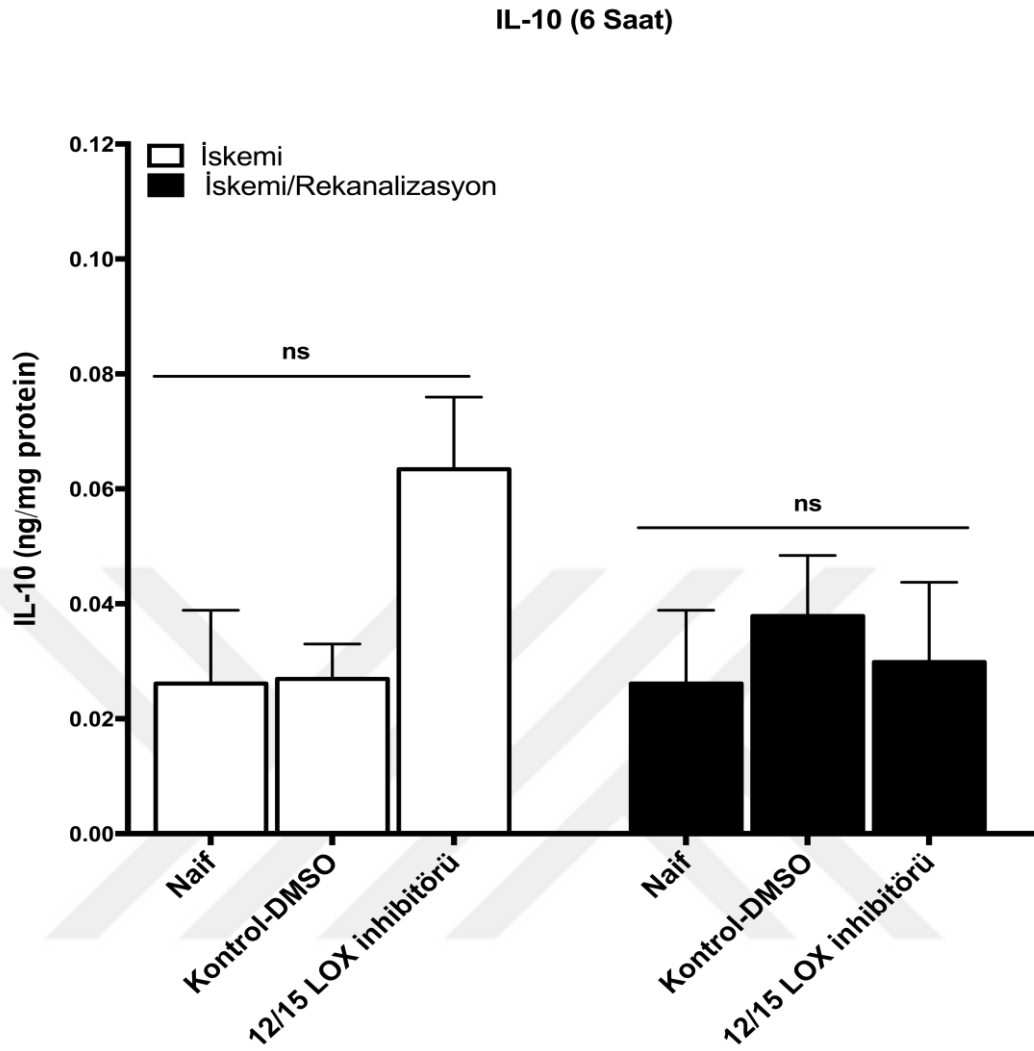


Şekil 4.39. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Kontrol (DMSO) grubuna ait örnekte TGF-beta immünohistokimyasal işaretlenmesi azalmış hücre çekirdeğine lokalize olmuştur (sol sütun). Aynı dokuda IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü yüksektir. Sol sütunun en alt satırında çakıştırılmış resimde TGF-beta ve IL-10 sinyalinin örtüştüğü görülmektedir. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (orta sütun). IL-10 işaretlenmesi hem hücresel yerleşimi hem de sinyal gücü bakımından naif örneğe benzemektedir.

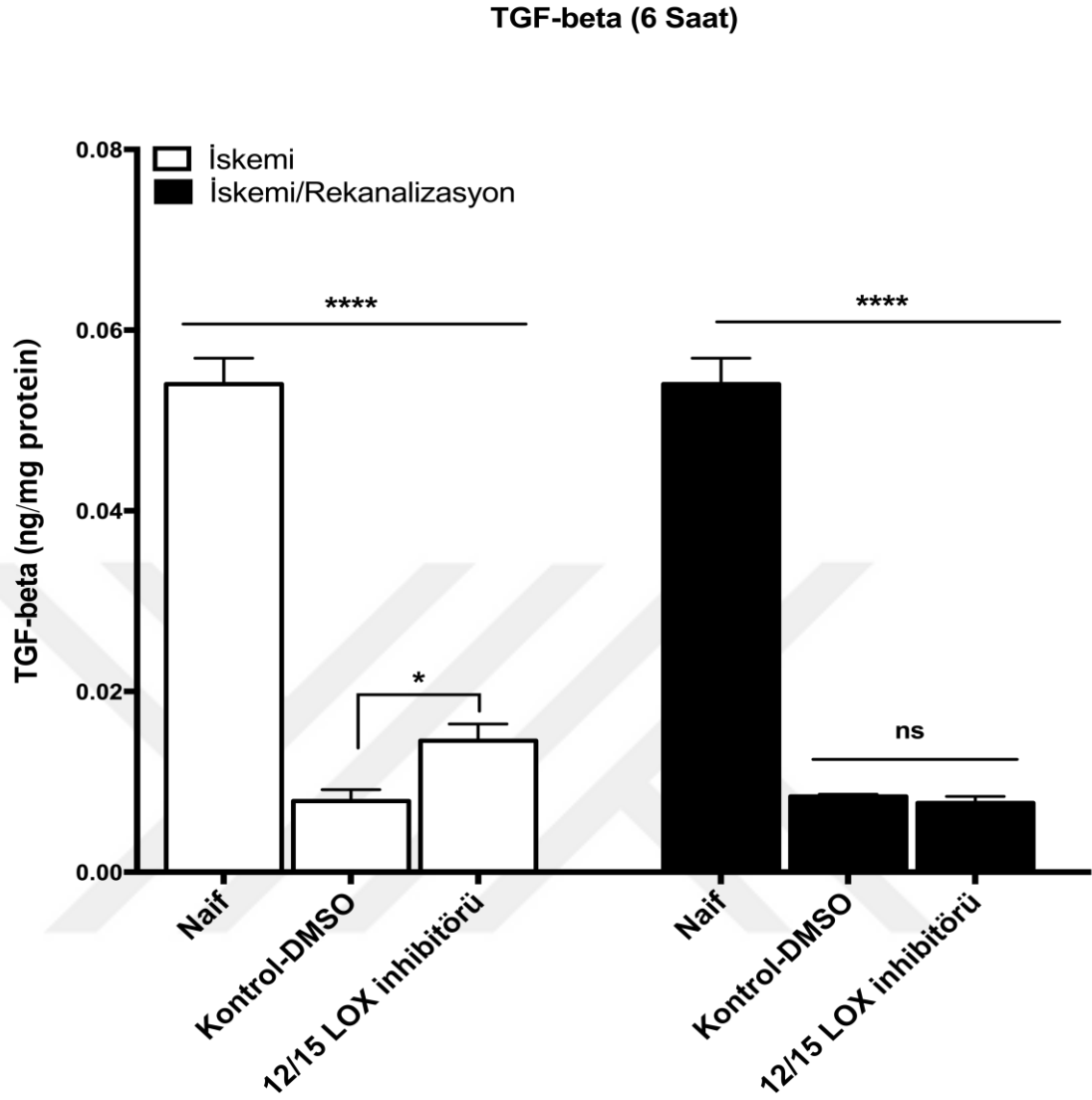
İskemi modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubu farelerin beyin dokusunda IL-10 miktarında değişiklik olmazken, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da konrole göre artış saptanmıştır ($p=0,059$; $n=3/\text{grup}$). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise gruplar arasında anlamlı fark

bulunmamaktadır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.40). Bu bulgu immünohistokimyada tedavi grubunda IL-10 sinyalinin artması bulgusu ile tutarlıdır.

İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin dokusunda ELISA yöntemi ile incelenen TGF-beta miktar tayininde, iskemiden 6 saat sonra kontrol grubunda TGF-beta miktarı naif gruba göre azalmış ($****p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$), tedavi ile kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($*p=0,0144$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.41). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise iskemi modelinde olduğu gibi kontrol grubunda TGF-beta miktarı, naif beyin dokusuna göre azalmıştır ($****p<0,0001$; $n=3/\text{grup}$). 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubunda ise TGF-beta miktarı kontrole göre farklılık göstermemiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.41).



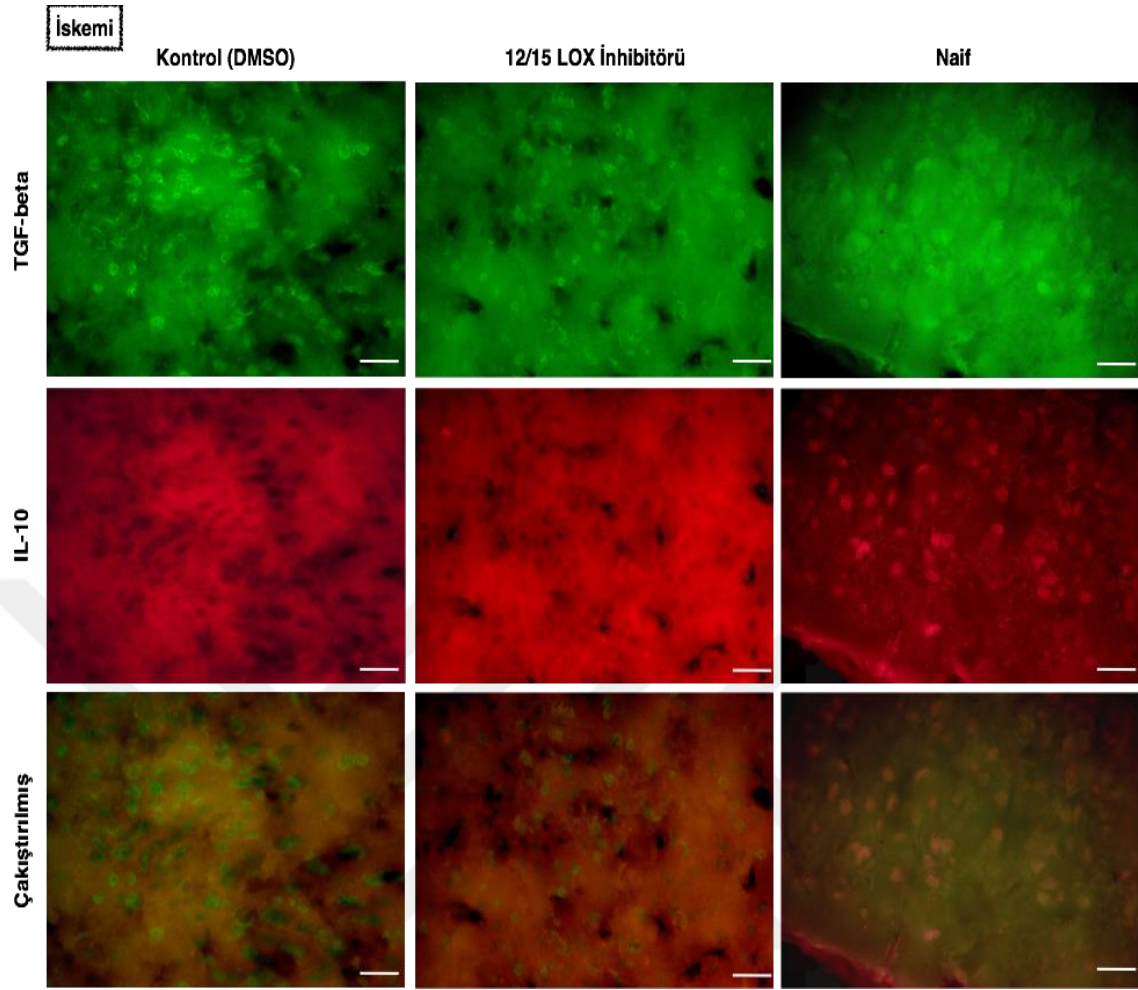
Şekil 4.40. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modelinin oluşturulduğu kontrol grubu farelerde IL-10 miktarı değişmemiştir. Tedavi grubunda ise IL-10 miktarı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da konrole göre artmıştır ($p=0,059$; $n=3/\text{grup}$). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.40).



Şekil 4.41. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. TGF-beta miktarının normal beyin dokusunda IL-10 proteinine göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. İskemiden 6 saat sonra kontrol grubunda TGF-beta miktarı naif gruba göre azalmıştır (**** $p < 0,0001$; $n = 3/\text{grup}$). Tedavi grubunda ise kontrol grubuna göre artış saptanmıştır (* $p = 0,0144$; $n = 3/\text{grup}$) (Şekil 4.41). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise iskemi modelinde olduğu gibi kontrol grubunda TGF-beta miktarı, naif beyin dokusuna göre azalmıştır (**** $p < 0,0001$; $n = 3/\text{grup}$). 12/15 LOX inhibitörü verilen tedavi grubunda ise TGF-beta miktarı kontrole göre farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$; $n = 3/\text{grup}$) (Şekil 4.41).

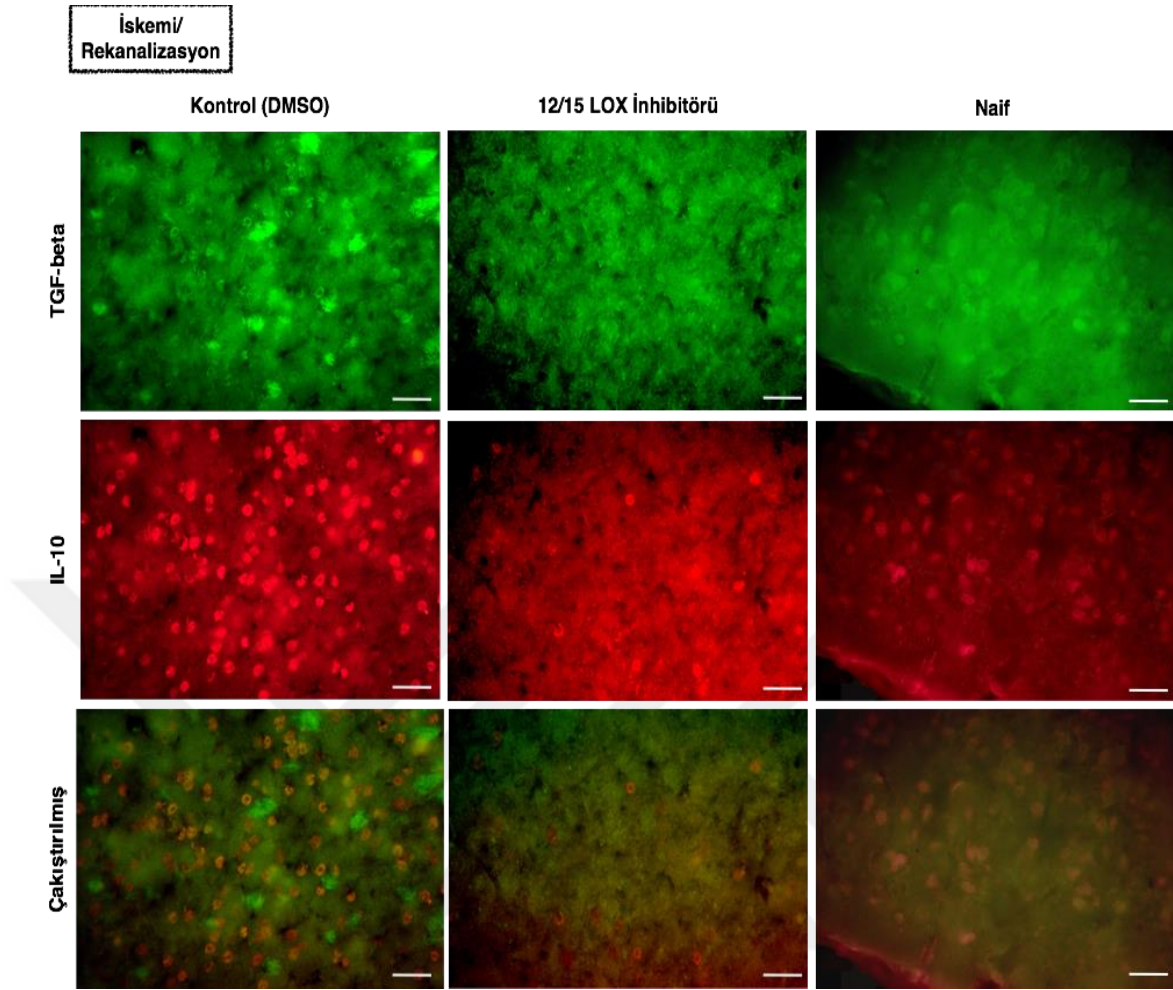
İskemi modeli oluşturulan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubu fare beyin dokularında, TGF-beta sinyali naif gruba göre azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (Şekil 4.42, sol sütun). Aynı dokuda IL-10 işaretlenmesi naif gruba göre azalmış ve sitoplazmik, çamurumsu bir sinyal izlenmiştir. Sol sütunun en alt satırında karşılaştırılmış resimde TGF-beta'nın hücrelerin içinde IL-10'un ise bunların çevresinde olduğu görülmüştür. Buna göre IL-10 salınmış olabilir. Tedavi grubunda kontrole göre TGF-beta sinyali azalmıştır, ancak yine sitoplazmik sinyal izlenmektedir (Şekil 4.42, orta sütun). IL-10 işaretlenmesi de yine kontrole benzer şekilde naif göre azalmış ve sitoplazmiktir (Şekil 4.42, orta sütun). Serebral iskeminin 24. saatinde TGF-beta sitoplazmik, IL-10 ise hücreden salınmıştır.





Şekil 4.42. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). İskemi modeli kontrol grubu fare beyin kesitinde, TGF-beta sinyali naif göre azalmış ve sitoplazmaya lokalize olmuştur (sol sütun). Aynı kesitte IL-10 işaretlenmesi naif gruba göre azalmış ve sitoplazmik, çamurumsu bir sinyal izlenmiştir. Sol sütunun en alt satırında çakıştırılmış resimde TGF-beta'nın hücrelerin içinde IL-10'un ise bunların çevresinde olduğu görülmüştür. Tedavi grubunda kontrole göre TGF-beta sinyali azalmıştır, ancak yine sitoplazmik sinyal izlenmektedir (orta sütun). IL-10 işaretlenmesi de yine kontrole benzer şekilde naif göre azalmış ve sitoplazmiktir (orta sütun).

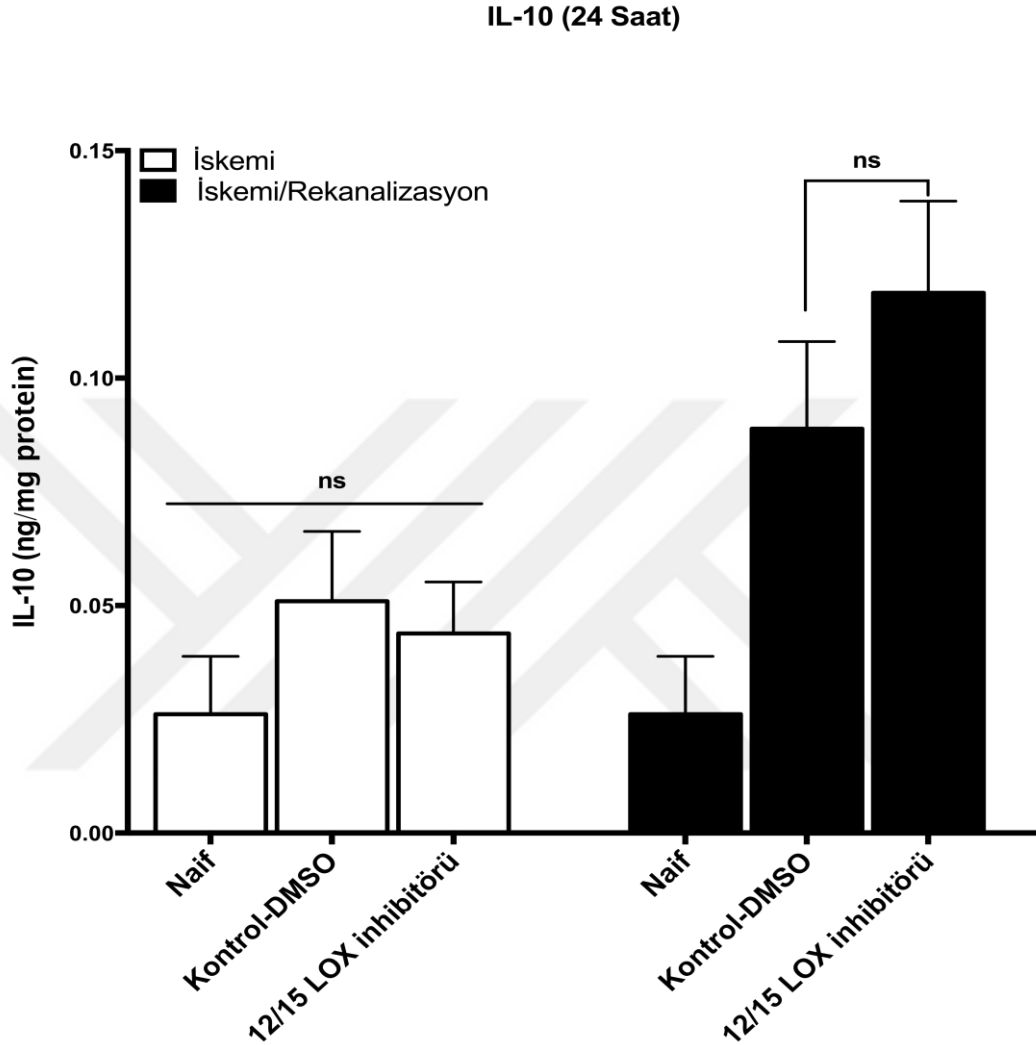
İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan ve 24 saat sonra kurban edilen kontrol grubu fare beyin dokularında, TGF-beta sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik yer yer ise çamurumsu, salınmış izlenimi vermektedir (Şekil 4.43, sol sütun). Aynı dokuda IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü belirgin olarak yüksektir. Sol sütunun en alt satırında karşılaştırılmış resimde TGF-beta ve IL-10 işaretlenme şeklinin farklı olmasına rağmen aynı hücrelerde ifade edildiği düşünülmüştür. IL-10'un iske mi/rekanalizasyonun 24. saatinde kontrol grubunda yeniden sentezlenmeye başladığı düşünülmüştür. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali azalmıştır (Şekil 4.43, orta sütun). IL-10 işaretlenmesi naif ve kontrole göre belirgin olarak azalmış ve birkaç hücrede kalmıştır (Şekil 4.43, orta sütun). Serebral iske mi/rekanalizasyon modelinde 24. saatte TGF-beta sinyali hem tedavi grubunda salınmış izlenimi vermektedir.



Şekil 4.43. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Kontrol grubu farelerin beyin kesitinde TGF-beta sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik yer yer ise çamurumsudur (sol sütun). Aynı kesitte IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü belirgin olarak yüksektir. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali azalmıştır (orta sütun). IL-10 işaretlenmesi naif ve kontrole göre belirgin olarak azalmış birkaç hücrede kalmıştır (orta sütun).

İskemi uygulanan grupta hem kontrol hem de tedavi verilen fare beyin örneklerinde ELİSA yöntemi ile saptanan IL-10 miktarı naif örneğe göre artış eğilimi gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise IL-10 miktarı kontrol ve tedavi gruplarında naif gruba göre artmıştır. Bu artış tedavi grubunda daha fazladır. Kontrol ve tedavi

grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.44).

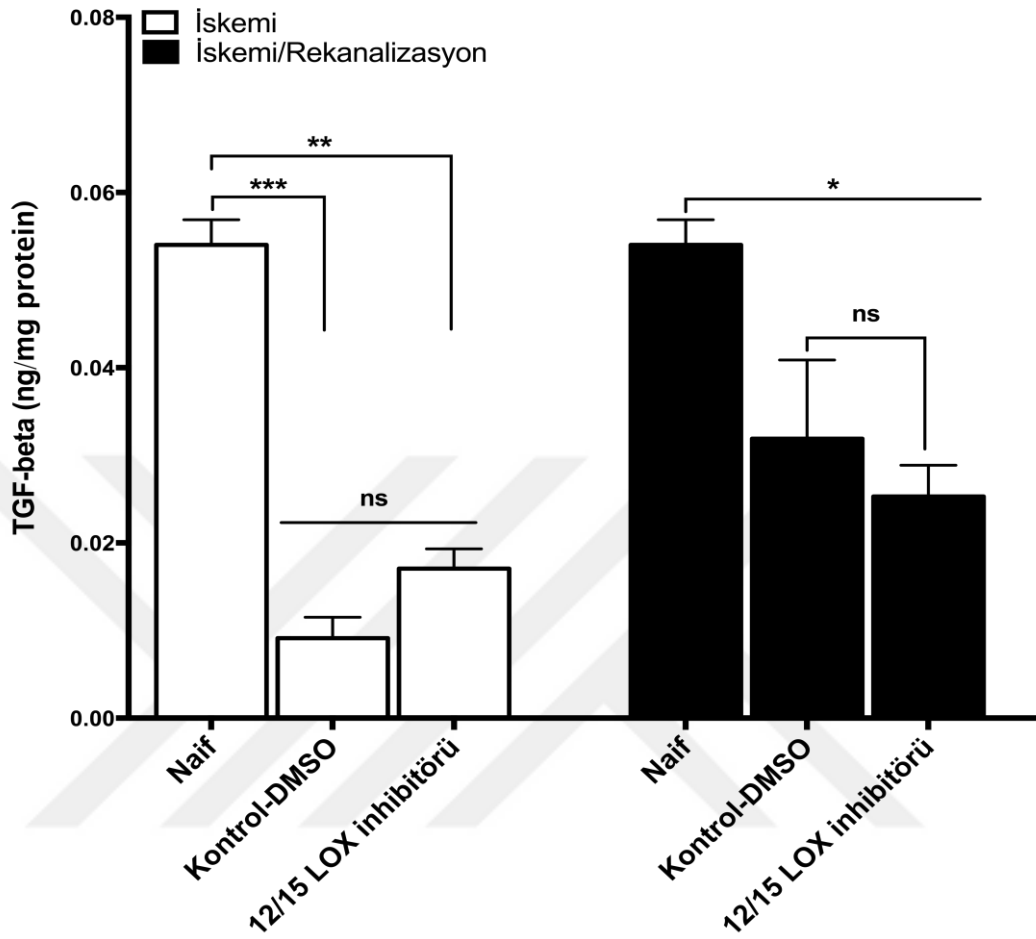


Şekil 4.44. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi uygulanan grupta hem kontrol hem de tedavi grubunda fare beyin örneklerinde IL-10 miktarı naif örneğe göre artış eğilimi gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$). İskemi/rekanalizasyon modelinde ise IL-10 miktarı kontrol ve tedavi gruplarında naif gruba göre artmıştır. Bu artış tedavi grubunda daha fazladır. Kontrol ve tedavi grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.44).

İskemi modeli uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda, TGF-beta miktarı naif gruba kıyasla kontrol grubunda anlamlı olarak azalmıştır (**p=0,0001; n=3/grup). Tedavi grubunda naif gruba göre azalmış (**p=0,0017; n=3/grup) olan TGF-beta miktarı, kontrole göre artış eğilimi göstermiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ve bu azalmanın iskemi modelinde daha belirgin olduğu saptanmıştır (p= 0,6118; n=3/grup).

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen fare beyin dokularında ise TGF-beta miktarı hem kontrol hem de tedavi gruplarında naif beyin dokusuna göre azalmıştır (p<0,05; n=3/grup). Kontrol ve tedavi gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,6580; n=3/grup) (Şekil 4.45).

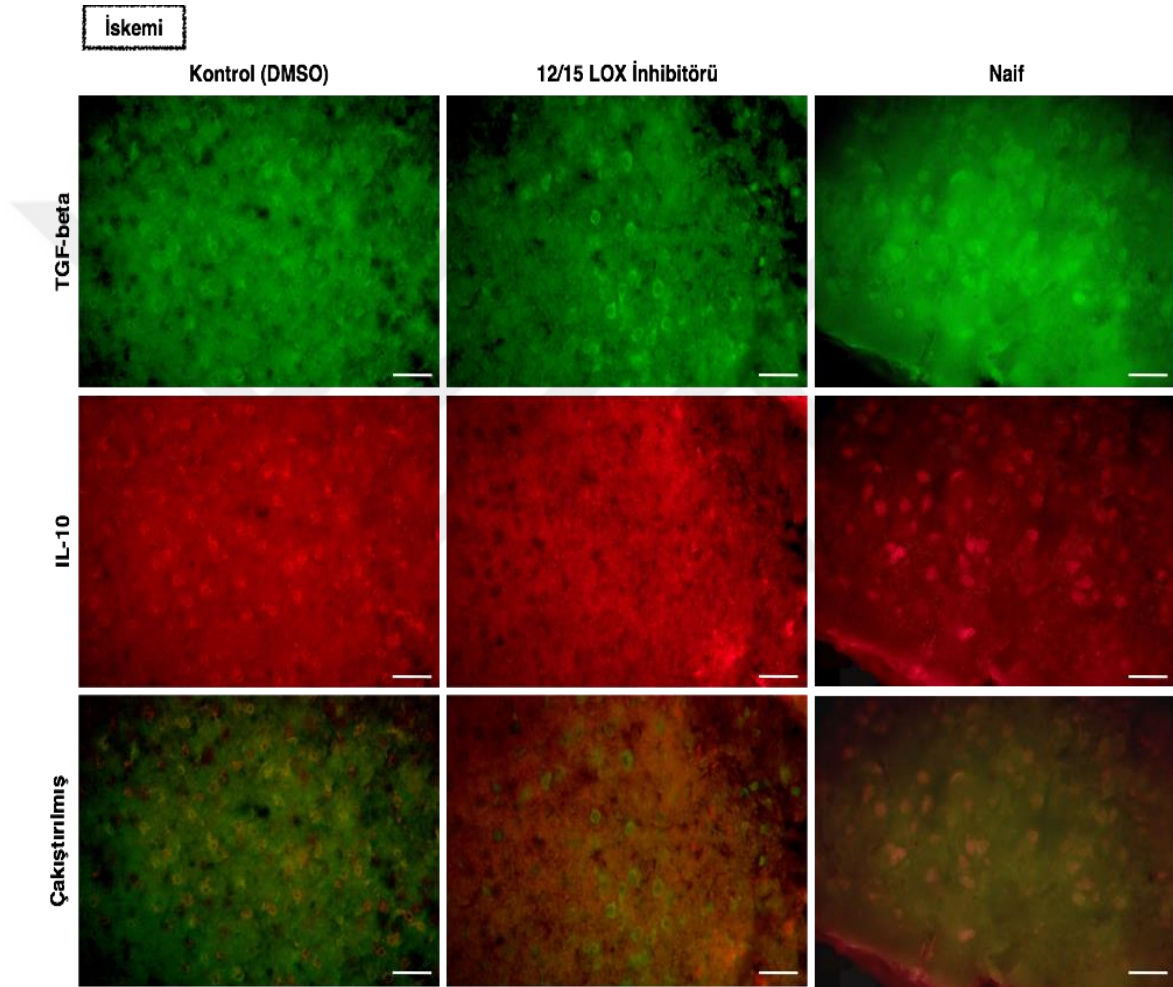
TGF-beta (24 Saat)



Şekil 4.45. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda anti-inflamatuvar sitokin olan TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemi modelinde TGF-beta miktarı, naif gruba kıyasla kontrol grubunda anlamlı olarak azalmıştır (**p=0,0001; n=3/grup). Tedavi grubunda naif gruba göre azalmış (*p=0,0017; n=3/grup) olan TGF-beta miktarı ise kontrole göre artış eğilimi göstermiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p= 0,6118; n=3/grup). İ/R modeli uygulanan fare beyin dokularında ise TGF-beta miktarı hem kontrol hem de tedavi gruplarında naif beyin dokusuna göre azalmıştır (*p=0,05 ve *p=0,0121; n=3/grup). Kontrol ve tedavi gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,6580; n=3/grup).

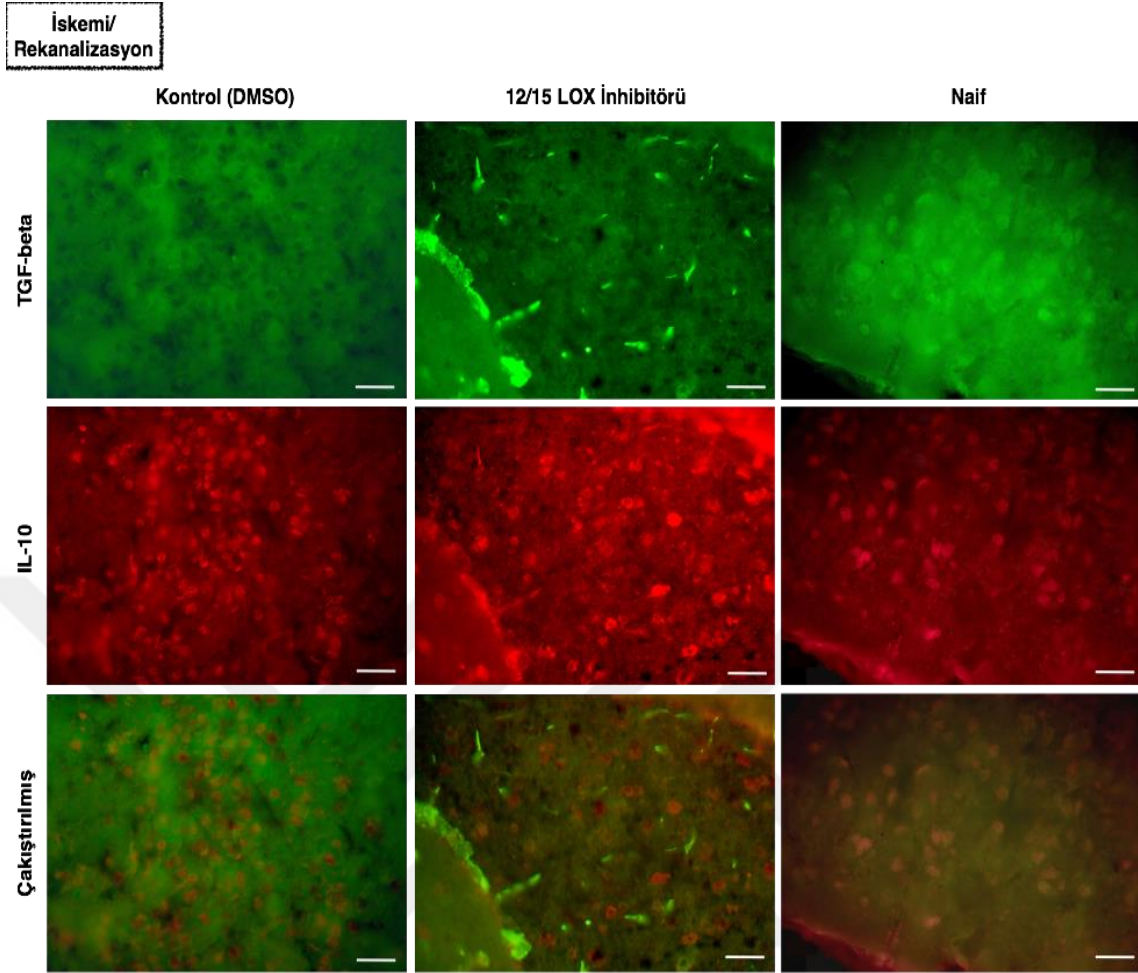
İskemi modeli oluşturulan ve 72 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubu fare beyin dokularında, TGF-beta sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik yer yer ise çamurumsu, salınmış izlenimi vermektedir (Şekil 4.46, sol sütun). Tedavi grubunda TGF-beta işaretlenmesi kontrole göre artmakla birlikte yine sitoplazmik ve

çamurumsudur (Şekil 4.46, orta sütun). IL-10 kontrol grubunda sitoplazmik ifade edilmiştir (sol, orta sütun). Tedavi grubunda ise IL-10 ifade eden hücre sayısı azalmıştır (orta sütun). IL-10 glia hücrelerinde pro-inflamatuvar sitokinleri inhibe ederek astrositleri aşırı inflamasyondan korur. Bu durumu astrositlerde TGF-beta üretimini tetikleyerek gerçekleştirir. Gözlemlediğimiz bulgular bu yönelimi desteklemektedir.



Şekil 4.46. İskemi modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 µm). Kontrol grubu farelerin beyin doku kesitinde TGF-beta sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik yer yer ise çamurumsudur (sol sütun). Tedavi grubunda ise TGF-beta işaretlenmesi kontrole göre artmakla birlikte yine sitoplazmik ve çamurumsudur (orta sütun). IL-10 kontrol grubunda sitoplazmik ifade edilmiştir (sol, orta sütun). Tedavi grubunda ise IL-10 ifade eden hücre sayısı azalmıştır (orta sütun).

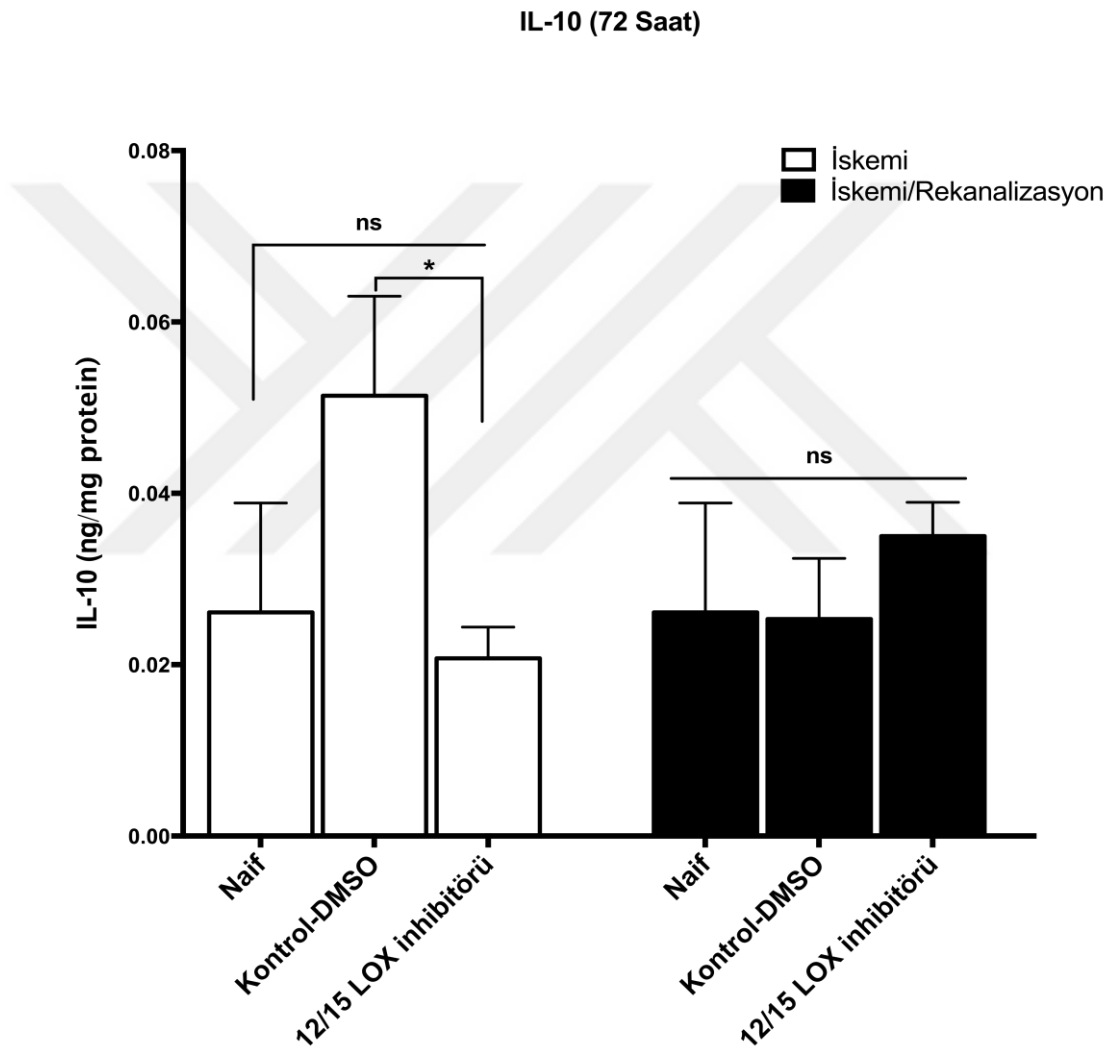
İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan ve 72 saat sonra kurban kurban edilen kontrol grubu fare beyin dokularında, TGF-beta sinyali naif beyne göre azalmış ve sitoplazmikdir (Şekil 4.47, sol sütun). Aynı dokuda IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü artmıştır. Sol sütunun en alt satırında karşılaştırılmış resimde IL-10'un hücrelerin çekirdeğinde, TGF-beta'nın ise aynı hücrelerin sitoplazmasında işaretlendiği düşünülmüştür. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali belirgin olarak azalmıştır (Şekil 4.47, orta sütun). IL-10 sinyali ise naif ve kontrole göre belirgin olarak artmış ve hem hücresel hem de sitoplazmik lokalizasyondadır (Şekil 4.47, orta sütun). Serebral iske mi/rekanalizasyon modelinde 72. saatte TGF-beta sinyali hem tedavi grubunda azalmış dolayısı ile salınmış izlenimi vermektedir. IL-10 sinyali ise hem kontrol hem de tedavide artmıştır, serebral iske minin geç döneminde enfarkt alanını çevreleyen hücrelerde anti-inflamatuvar yanıtı aktif tutarak hasarın sınırlı kalmasını sağlıyor olabilir.



Şekil 4.47. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin, beyin doku kesitlerinde TGF-beta ve IL-10 proteinlerinin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere iskemiden 1 saat sonra DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Kontrol grubu fare beyin dokularına ait kesitte TGF-beta sinyali naif beyne göre azalmış ve sitoplazmiktir (sol sütun). Aynı kesitte IL-10 işaretlenmesi hücrelidir ve naif gruba göre sinyal gücü artmıştır. Sol sütunun en alt satırında çakıştırılmış resimde IL-10'un hücrelerin çekirdeğinde, TGF-betanın ise aynı hücrelerin sitoplazmasında işaretlendiği görülmektedir. Tedavi grubunda naif örneğe göre TGF-beta sinyali belirgin olarak azalmıştır (orta sütun). IL-10 sinyali ise naif ve kontrole göre artmıştır. Ayrıca hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (orta sütun).

İskemi modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında ELISA ile IL-10 miktar analizi yapılmıştır. Buna göre iskemiden 1 saat sonra DMSO enjekte edilen fare beyin dokularında IL-10 protein miktarı naif gruba göre artmıştır ($p>0,05$; $n=3$ /grup). İskemiden 1 saat sonra 12/15 LOX inhibitörü enjekte edilen tedavi grubu farelerin beyin dokusunda ise IL-10 miktarı kontrole göre

azalmıştır (* $p=0,0458$; $n=3$ /grup). (Şekil 4.48). IL-10, Th1 sitokinlerinin regülasyonu üzerinde etkilidir. Glia hücrelerini inflamasyonun aşırı etkilerinden korur. İskemi/rekanalizasyon modelinde iskemiden 1 saat sonra yani rekanalizasyonun hemen ardından farelere 12/15 LOX inhibitörünün enjekte edilmesi inflamasyonun 72. saatinde IL-10 miktarında değişikliğe yol açmamıştır ($p>0,05$; $n=3$ /grup) (Şekil 4.48).

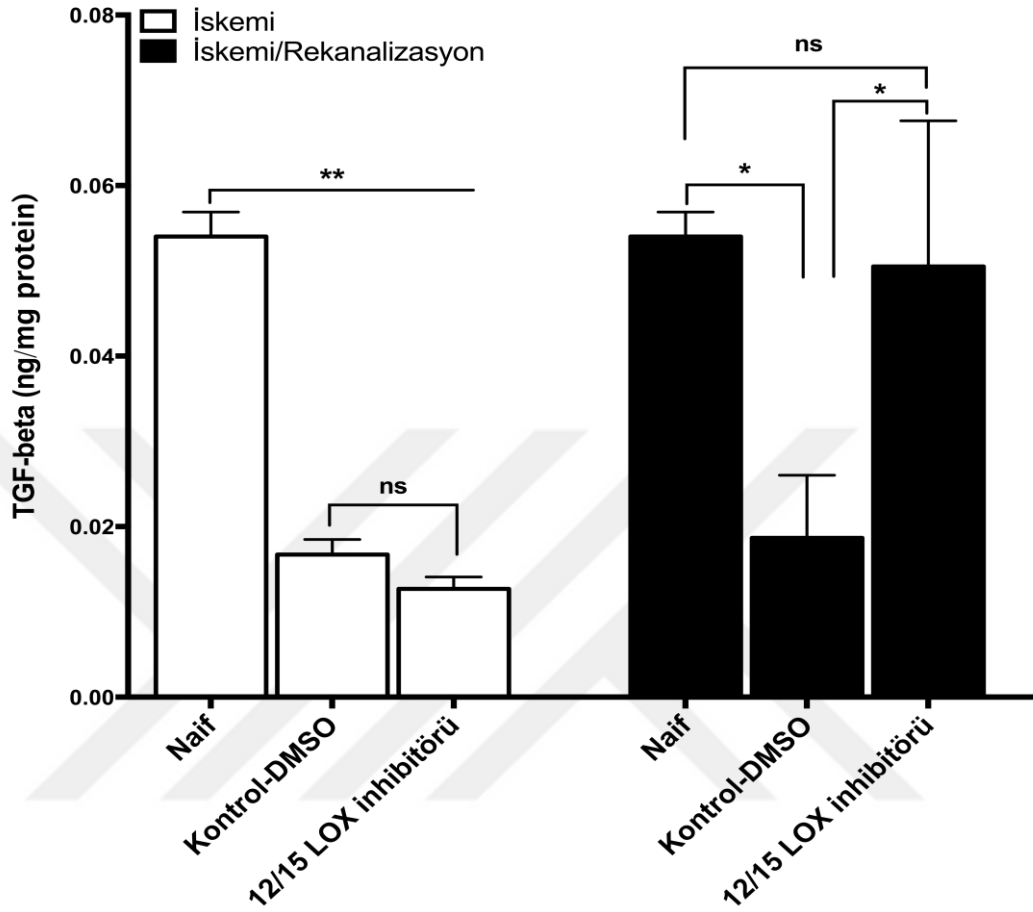


Şekil 4.48. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda IL-10 proteininin ELISA ile kantitatif analizi. İskemiden 1 saat sonra kontrol grubu farelere DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemiden 1 saat sonra DMSO enjekte edilen kontrol grubu farelerin beyin dokusunda IL-10 protein miktarı naif gruba göre artmıştır ($p>0,05$; $n=3$ /grup). Tedavi grubu farelerin beyin dokusunda ise IL-10 miktarı kontrole göre azalmıştır (* $p=0,0458$; $n=3$ /grup). İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan farelerin beyin dokusunda ise naif gruba

göre IL-10 miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$).

İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda ELISA ile TGF-beta miktarları ölçülmüştür. Naif gruba göre hem kontrol (** $p=0,0088$; $n=3/\text{grup}$) hem de tedavi gruplarında (** $p=0,0036$; $n=3/\text{grup}$) TGF-beta miktarları azalmıştır. Kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.49). İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 1 saat sonra DMSO enjekte edilen kontrol grubu farelerin beyin dokusunda TGF-beta miktarı belirgin şekilde azalmıştır (* $p=0,0194$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi grubunda ise TGF-beta seviyesi kontrole göre anlamlı olacak şekilde artmış (* $p=0,0185$; $n=3/\text{grup}$) ve naif grupta ölçülen TGF-beta miktarına yaklaşmıştır ($p=0,956$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.49).

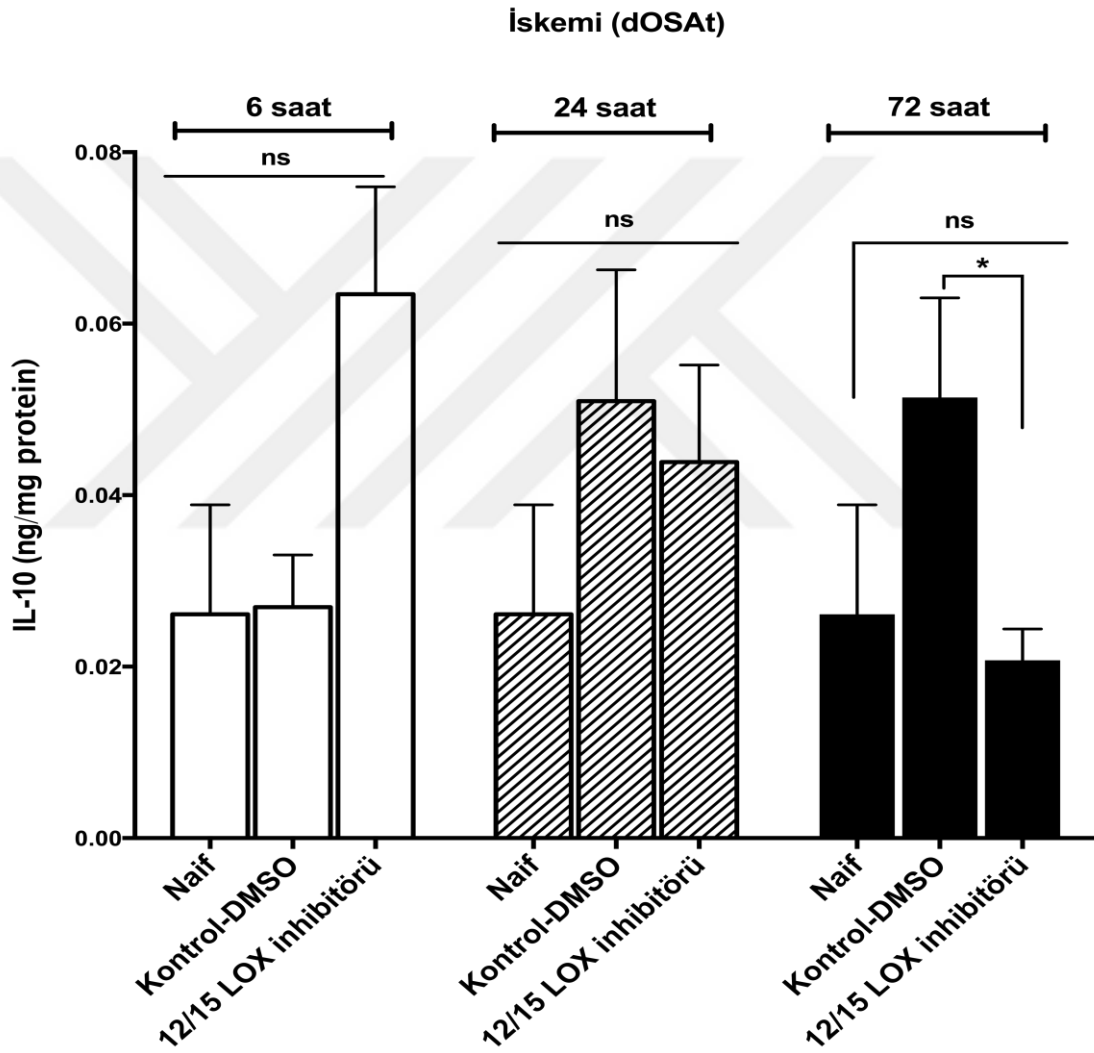
TGF-beta (72 Saat)



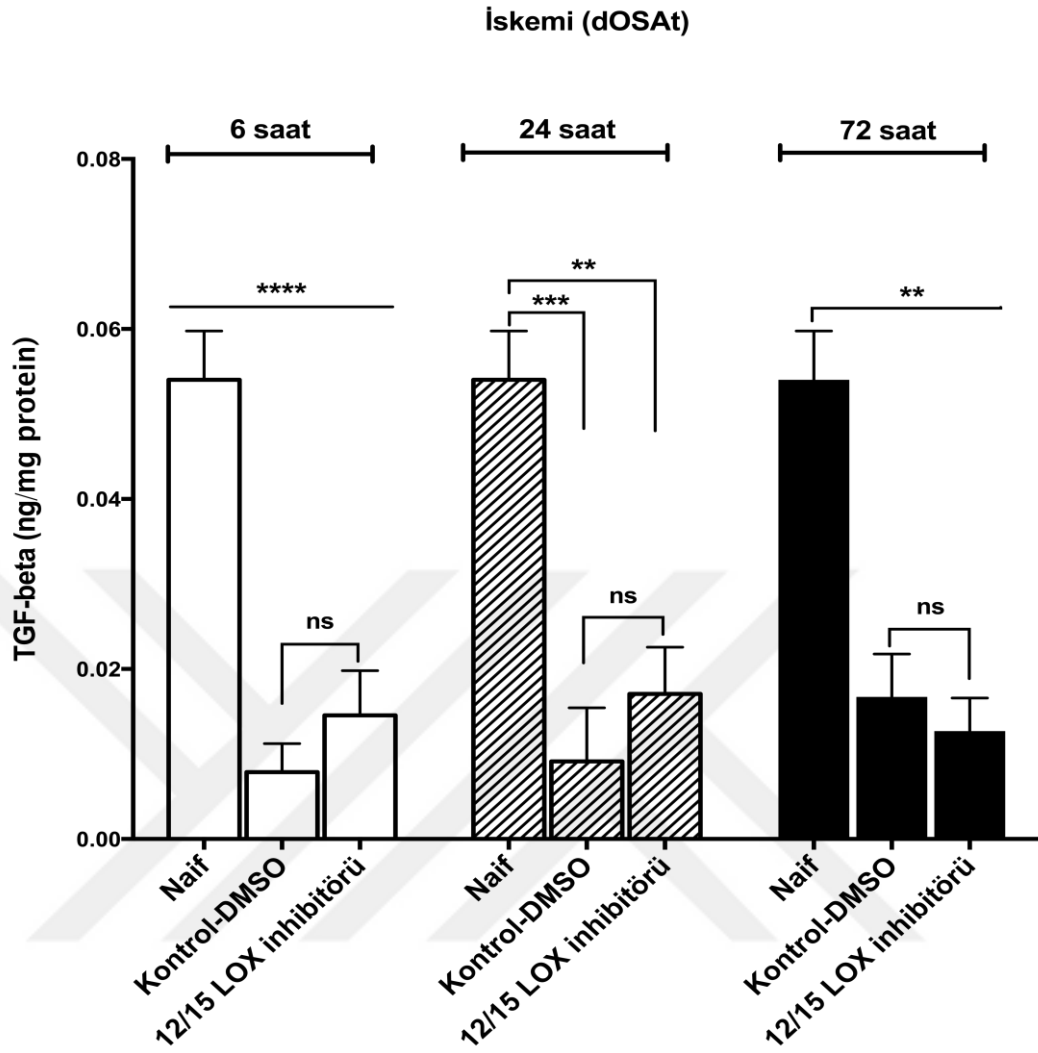
Şekil 4.49. İskemi veya iskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda TGF-beta proteininin ELISA ile kantitatif analizi. İskemiden 1 saat sonra kontrol grubu farelere DMSO (i.p.), tedavi grubu farelere ise 12/15 LOX inhibitörü (i.p. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir. İskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokusunda ELISA ile TGF-beta miktarları ölçülmüştür. Naif gruba göre hem kontrol (**p=0,0088; n=3/grup) hem de tedavi gruplarında (**p=0,0036; n=3/grup) TGF-beta miktarları azalmıştır. Kontrol ve tedavi grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05; n=3/grup). İ/R modeli oluşturulduktan 1 saat sonra DMSO enjekte edilen kontrol grubu farelerin beyin dokusunda ise TGF-beta miktarı belirgin şekilde azalmıştır (*p=0,0194; n=3/grup). Tedavi grubunda ise TGF-beta seviyesi kontrole göre artmış (*p=0,0185; n=3/grup) ve naif grupta ölçülen TGF-beta miktarına yaklaşmıştır (p=0,956; n=3/grup).

Kalıcı iskemi modeli uygulandıktan 6, 24 veya 72 sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında ELISA ile TGF-beta ve IL-10 anti-inflamatuvar sitokin miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları bir arada verilerek zamansal farklılıkları

özetlenmiştir (Şekil 4.50, 4.51). İskemi ile indüklenen inflamasyonun akut döneminde (6 ve 24 saat) tedavi ile IL-10 yanıtı uyarılarak naif gruba göre artmıştır (Şekil 4.50). İskemiden 72 saat sonra ise IL-10 yanıtı kontrol grubunda artmış ve tedavi ile anlamlı olarak azalmıştır. Her üç zaman noktası için de kontrol ve tedavi gruplarında ölçülen TGF-beta miktarları naif gruba göre azalmıştır. Tedavi ile 6 ve 24 saatte TGF-beta yanıtı artma eğilimi göstermiş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$; $n=3/\text{grup}$) (Şekil 4.51).



Şekil 4.50. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-10 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. ($p<0,05$; $n=3/\text{grup}$) İskemi ile indüklenen inflamasyonun akut döneminde IL-10 yanıtında değişiklik olmamıştır. İskemiden 24 ve 72 saat sonra IL-10 uyarılarak naif gruba göre artmıştır. ($p=0,02$; $n=3/\text{grup}$). Tedavi ile IL-10 miktarı 6. saatte naif ve kontrol gruplarına göre artış gösterirken, 72. saatte kontrol grubuna göre azalmıştır.



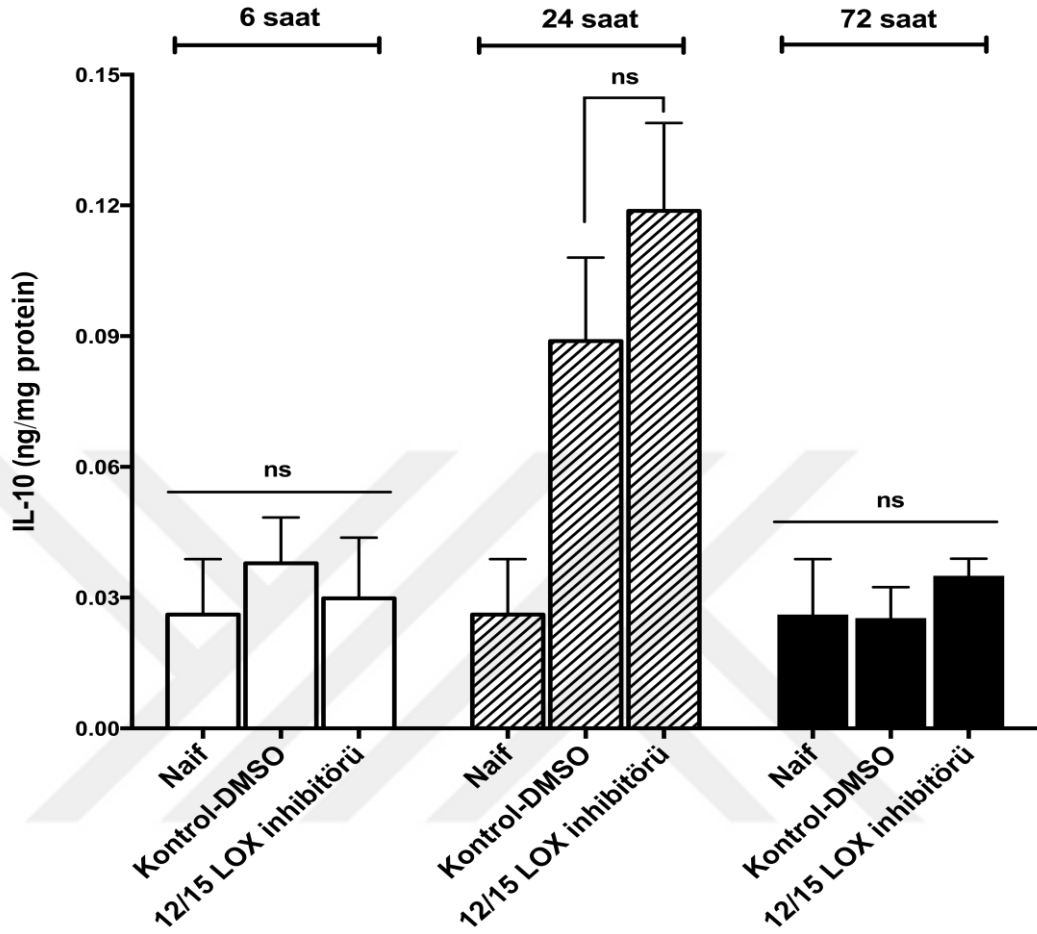
Şekil 4.51. İskemi modeli oluşturulan fare beyin dokularında TGF-beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. Her üç zaman noktası için de kontrol ve tedavi gruplarında ölçülen TGF-beta miktarları naif gruba göre azalmıştır. Zamansal olarak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$; $n = 3/\text{grup}$).

İskemi/rekanalizasyon modeli uygulandıktan 6, 24 veya 72 sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında ELISA ile TGF-beta ve IL-10 anti-inflamatuvar sitokin miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları bir arada verilerek zamansal farklılıkları özetlenmiştir (Şekil 4.52, 4.53). Buna göre IL-10, iskemiden/rekanalizasyondan 6 saat sonra uyarıya cevap olarak kontrol grubunda naif gruba göre artış eğilimi gösterip, bu artış 24. saatte de devam edip belirgin düzeye ulaşmıştır. İnflamasyonun 72. saatinde ise IL-10 yanıtının indüklenmediğini görmekteyiz (Şekil 4.52).

TGF-beta ise iskemide/rekanalizasyondan sonraki üç farklı zaman noktasında da oluşan doku hasarına karşı kontrol grubunda naif beyne göre azalmıştır. Tedavi inflamasyonun 72. saatinde yani geç döneminde etki gösterip, azalan TGF-beta seviyesini naif dokuda ölçülen seviyeye yükseltmiştir ve bu artış anlamlıdır (Şekil 4.53).

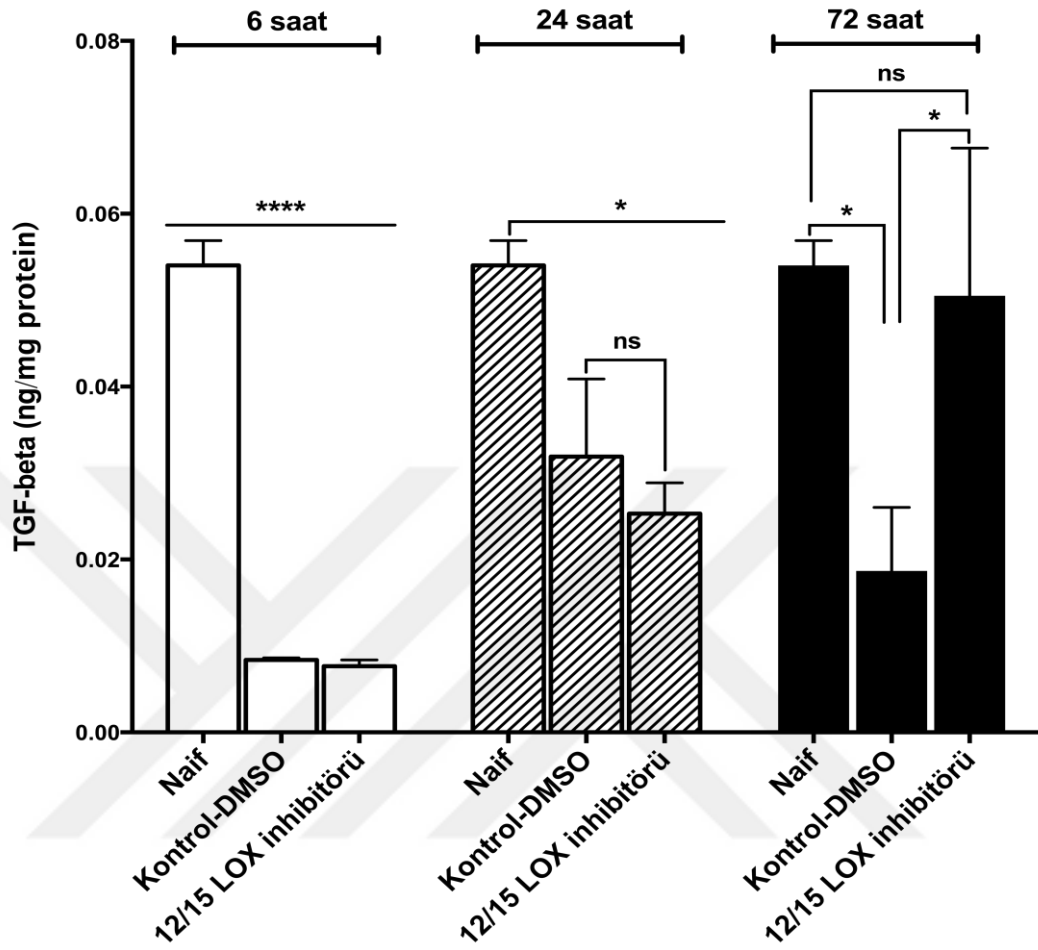
Buna göre iki model arasında anti-inflamatuvar sitokin seviyelerindeki değişimin iskemide/rekanalizasyon modelinde daha belirgin olduğunu görmekteyiz. Bu da bize 12/15 LOX gibi anti-inflamatuvar inme tedavilerinin, rekanalizasyon uygulanan inme hastalarında daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısı ile hastada oluşan inme türü, uygulanacak anti-inflamatuvar tedavilerde önemli ve yol gösterici olabilir.

İskemi/Rekanalizasyon-(pOSAt)



Şekil 4.52. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında IL-10 sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. IL-10, İ/R'den 6 saat sonra uyarıya cevap olarak kontrol grubunda naif gruba göre artış eğilimi göstermiştir. Bu artış 24. saatte de devam edip belirgin düzeye ulaşmıştır. İnflamasyonun 72. saatinde ise IL-10 yanıtının 6. saat seviyelerine geri döndüğü saptanmıştır.

İskemi/Rekanalizasyon-(pOSAt)



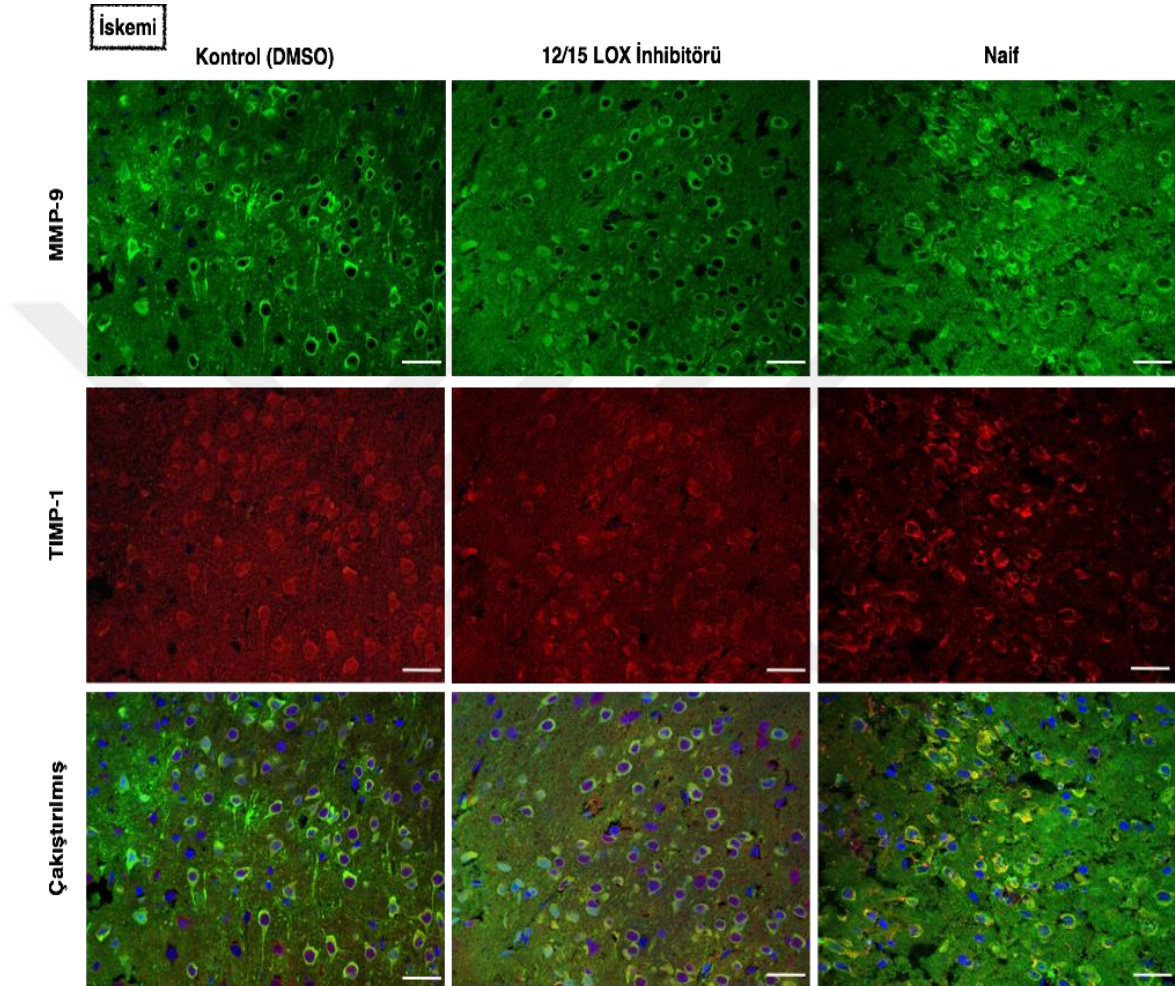
Şekil 4.53. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulan fare beyin dokularında TGF-beta sitokin miktarlarının (ng/mg protein), 6, 24 ve 72. saatlerdeki değişimlerinin grafiksel gösterimi. Gruplar arası karşılaştırmalar için çoklu t-testi kullanılmıştır. TGF-beta miktarı üç farklı zaman noktasında da oluşan doku hasarına karşı azalma göstermiştir. Tedavi 72. saatte yani inflamasyonun geç döneminde etki gösterip, kontrol grubunda azalan TGF-beta seviyesini naif dokuda ölçülen seviyeye yükseltmiştir.

4.8. Serebral İskemi İle Artan Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinde MMP-9 ve TIMP-1 Proteinlerinin Farklı İskemi Modelleri ve Farklı Zaman Noktalarında Değerlendirilmesi

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstraselüler matriks proteinlerini yıkan bir enzim ailesidir. MMP'ler inaktif latent enzim olarak sentezlenir. Plazminojen aktivatör veya pro-hormon konvertaz (furin) ile aktif forma dönüşürler (116). MMP aktivitesi doku metalloproteinaz inhibitörü denilen endojen proteinler (TIMP) tarafından regüle edilir (116). Özellikle MMP-9 enziminin serebral iskemi sonrası arttığı ve kan beyin bariyerini yıkarak doku hasarını artırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (117). İnsan inme vakalarında tPA tedavisi sonrası hemorajik transformasyon oluşumunda MMP-9'un önemli rolü olduğu bilinmektedir. tPA MMP-9 aktivitesinde artışa neden olmaktadır. MMP-9'u inhibe ettiği bilinen TIMP-1 geni silinen farelerde serebral iskemi sonrası MMP-9 ifadesinin arttığı ve bunun enfarkt hacmi artışına neden olduğu bildirilmiştir (117). Proje ortağımız olan van Leyen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada baicalein isimli 12/15 LOX inhibitörünün iskemi modeli uygulanan farelerde kan beyin bariyeri geçirgenliğini kontrole göre azalttığı gösterilmiştir (74). Bu çalışmada lipoksijenazların kan beyin bariyeri üzerinde etkili olduğu claudin 5 sıkı kavşak proteini ile immünohistolojik analiz yapılarak ve dokudaki ödem miktarı ölçülerek belirlenmiştir (74).

Bu tez çalışmasında serebral iskemi sonrası MMP-9 ve TIMP-1 immünoaktivitesi iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda ve farklı zaman noktalarında (6, 24, 72 saat) elde edilen fare beyin kesitlerindeki immünohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 4.54'de sağdaki sütunda naif beyin kesitinde MMP-9 ve TIMP-1 immünoaktivitesinin sitoplazmik olduğu izlenmiştir. Patolojik uyarı olmaksızın her iki protein de hücrede ifade edilmektedir. Kalıcı iskemi uygulanan ve 6 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubunda ise MMP-9 sinyalinin hem sitoplazmada hem de hücre uzantılarında arttığı görülmüştür (Şekil 4.54., sol sütun). TIMP-1 işaretlenmesi de kontrol grubunda artmıştır. Hücre çekirdeği, sitoplazma ve hücre uzantılarında sinyal izlenmektedir. Yani TIMP-1 ifadesi MMP-9 artışını kontrol edebilmek için yer yer çekirdekte de ifade edilmeye başlamış. Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif gruba benzer şekilde hücre uzantılarında ifade edilmeyerek sadece sitoplazmaya lokalize kalmıştır, ancak sinyalin arttığı

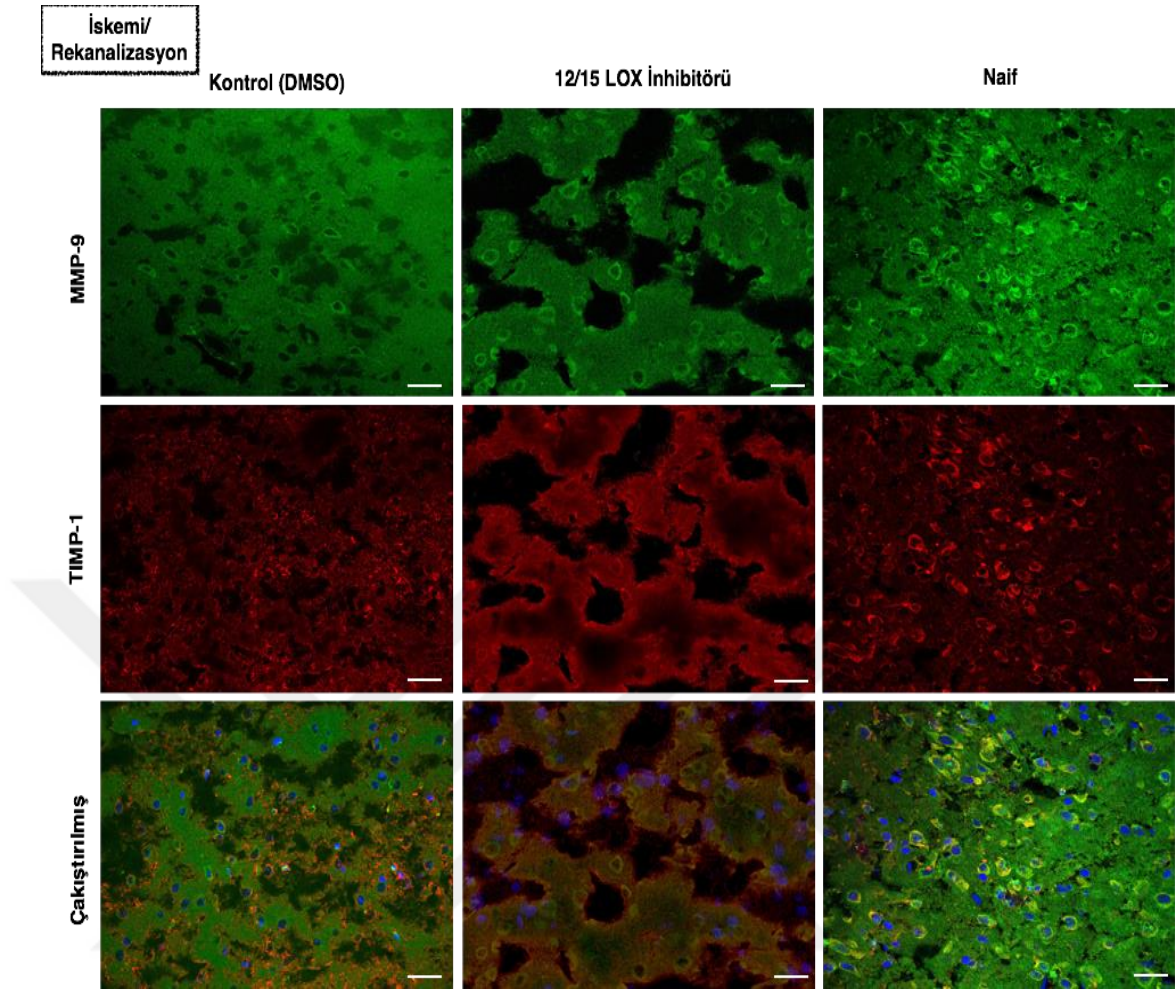
görülmektedir (Şekil 4.54., orta sütun). TIMP-1 işaretlenmesinde de artış olmakla birlikte hücre uzantılarında sinyal görülmemiştir. Bu bulgulara dayanarak iskemiden 6 saat sonra 12/15 LOX inhibisyonunun kan beyin bariyeri geçirgenliğini azaltma eğilimi gösterdiğini söyleyebiliriz (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. İskemi modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, Matriksmetaloproteinaz-9 (MMP-9) ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). Sağdaki sütunda naif beyin kesitinde MMP-9 ve TIMP-1 immünoreaktivitesinin sitoplazmik olduğu izlenmiştir. Kontrol grubuna ait örnekte MMP-9 sinyalinin hem sitoplazmada hem de hücre uzantılarında arttığı görülmüştür (sol sütun). TIMP-1 işaretlenmesi de artmıştır, Hücre çekirdeği, sitoplazma ve hücre uzantılarında sinyal izlenmektedir. Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif gruba benzer şekilde hücre uzantılarında ifade edilmeyerek sadece sitoplazmaya lokalize kalmıştır, ancak sinyalin arttığı görülmektedir (orta sütun). TIMP-1 işaretlenmesinde de artış olmakla birlikte hücre uzantılarında sinyal görülmemiştir.

İskemi/rekanalizasyon uygulandıktan 6 saat sonra sakrifiye edilen DMSO enjekte edilmiş kontrol grubu farelerin beyin kesitlerinde MMP-9 sinyalinin azaldığı ve sitoplazmada olduğu görülmektedir (Şekil 4.55., sol sütun). TIMP-1 işaretlenmesinin kontrol grubunda arttığı ve sitoplazmada lokalize olduğu izlenmektedir. Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif gruba göre azalmış ve sitoplazmaya lokalize kalmıştır (Şekil 4.55., orta sütun). TIMP-1 işaretlenmesi ise hem naif hem de kontrole göre azalmıştır, hücrelerin sitoplazmalarında yer almaktadır. Bu bulgulara dayanarak iskemi/rekanalizasyondan 6 saat sonra 12/15 LOX inhibisyonunun kontrole göre farklı bir etki göstermediği söylenebilir.

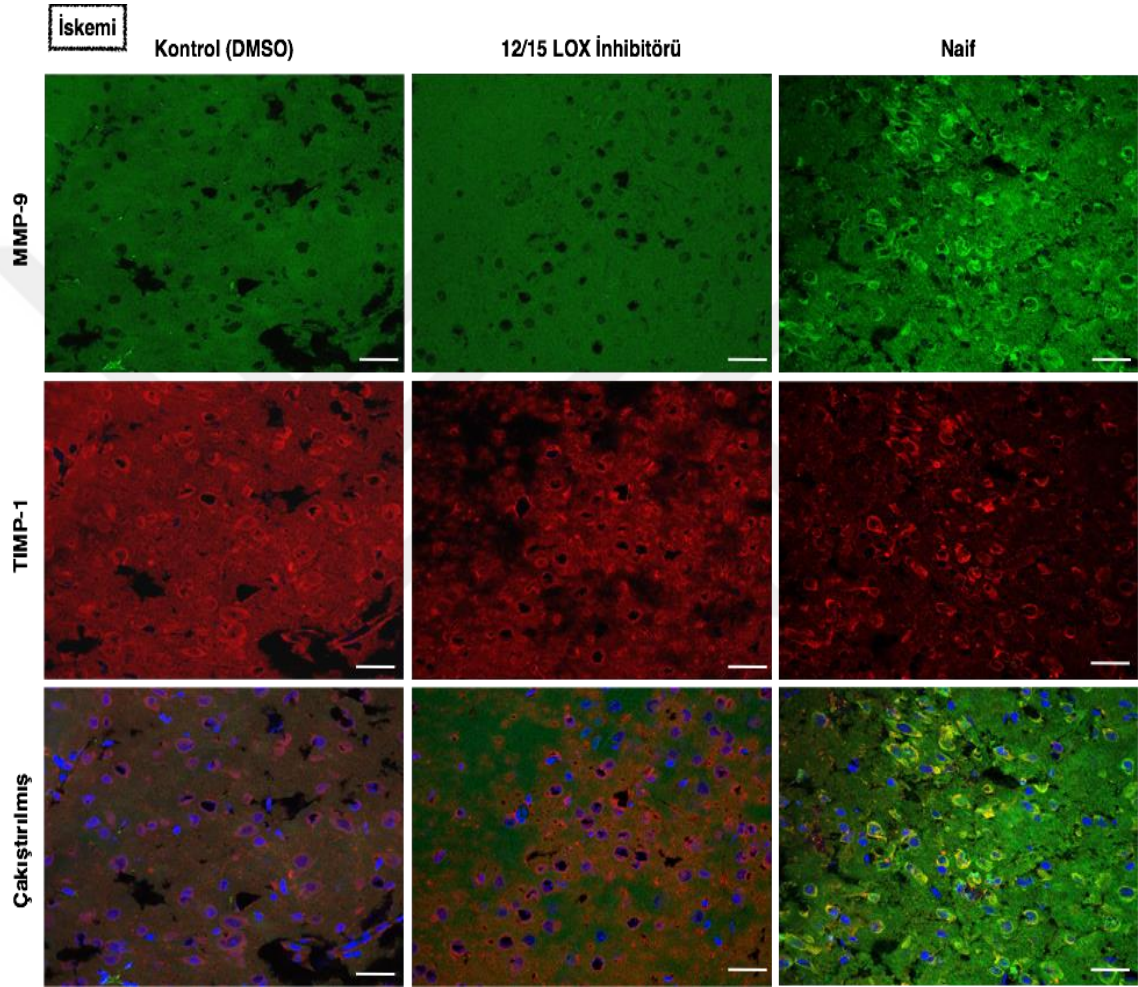




Şekil 4.55. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 6 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). Kontrol grubunda MMP-9 sinyalinin azaldığı ve sitoplazmada olduğu görülmektedir (sol sütun). TIMP-1 işaretlenmesinin kontrol grubunda arttığı ve sitoplazmada lokalize olduğu izlenmektedir (sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif gruba göre azalmış ve sitoplazmaya lokalize kalmıştır (orta sütun). TIMP-1 işaretlenmesi ise hem naif hem de kontrole göre azalmıştır, hücrelerin sitoplazmalarında yer almaktadır.

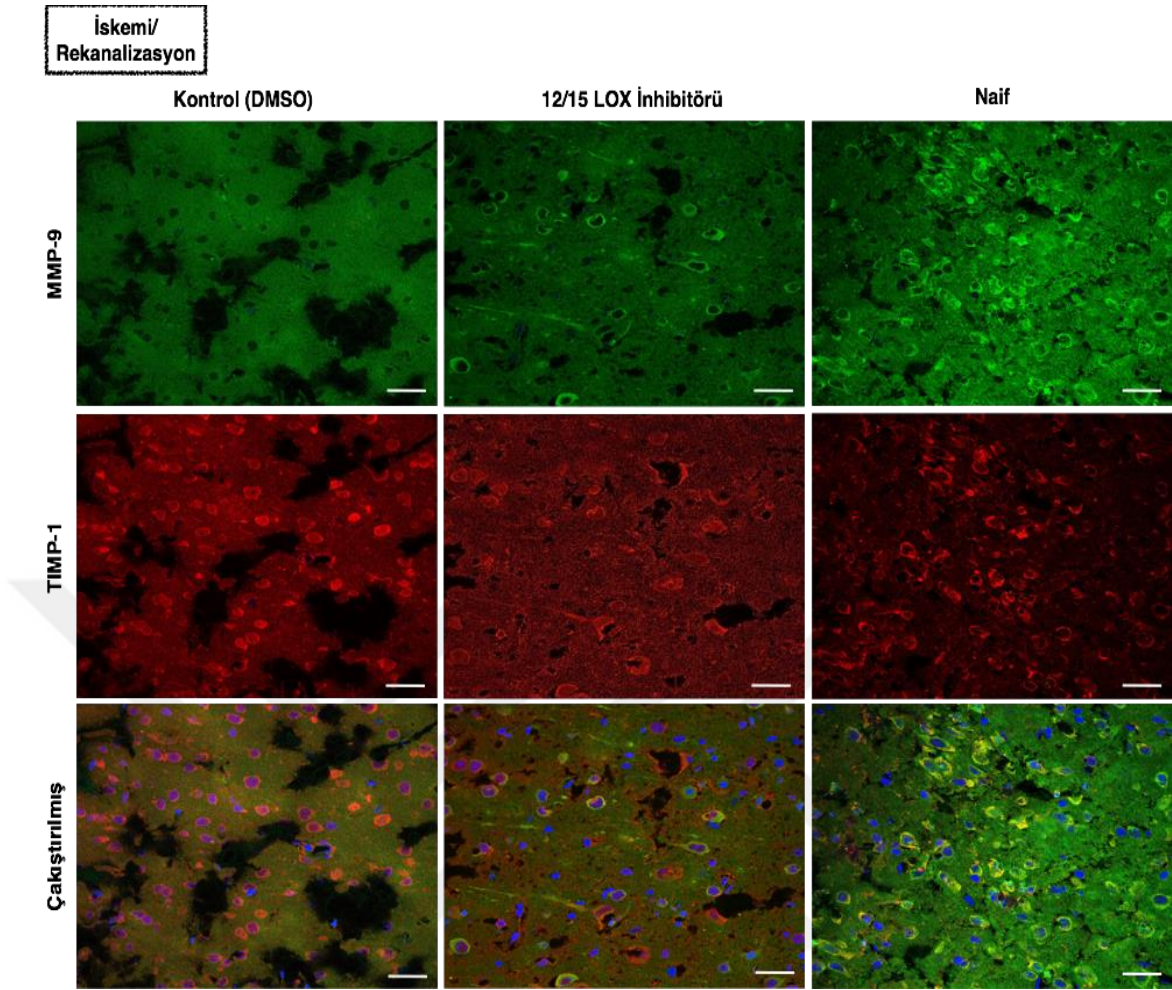
Kalıcı iskemi uygulanan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen gruplarda kontrol grubunda MMP-9 sinyalinin difüz ve çamurumsu olduğu, hücreden salındığı düşünülmüştür (Şekil 4.56., sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda artmıştır, hücre çekirdeğinde ancak daha çok sitoplazmada yer almaktadır (Şekil 4.56., sol sütun). Yani TIMP-1 ifadesi MMP-9 artışını kontrol edebilmek için artmıştır. Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi azalmıştır, bazı hücrelerin çekirdeklerinde ifade

edildiği görülmüştür (Şekil 4.56., orta sütun). TIMP-1 sinyali de naif örneğe göre artmıştır ve sitoplazmik yerleşim göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak iskemiden 24 saat sonra TIMP-1 sinyalinin iki grupta da arttığı ve MMP-9'u baskıladığı söylenebilir. Ancak tedavi bu etkiyi değiştirmemiştir.



Şekil 4.56. Kalıcı iskemi modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 μ m). Kontrol grubunda MMP-9 sinyalinin difüz ve çamurumsu olduğu görülmüştür (sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda artmıştır, hücre çekirdeğinde ancak daha çok sitoplazmada yer almaktadır (sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi azalmıştır, bazı hücrelerin çekirdeklerinde ifade edildiği görülmüştür (orta sütun). TIMP-1 sinyali de naif örneğe göre artmıştır ve sitoplazmik yerleşim göstermiştir (orta sütun).

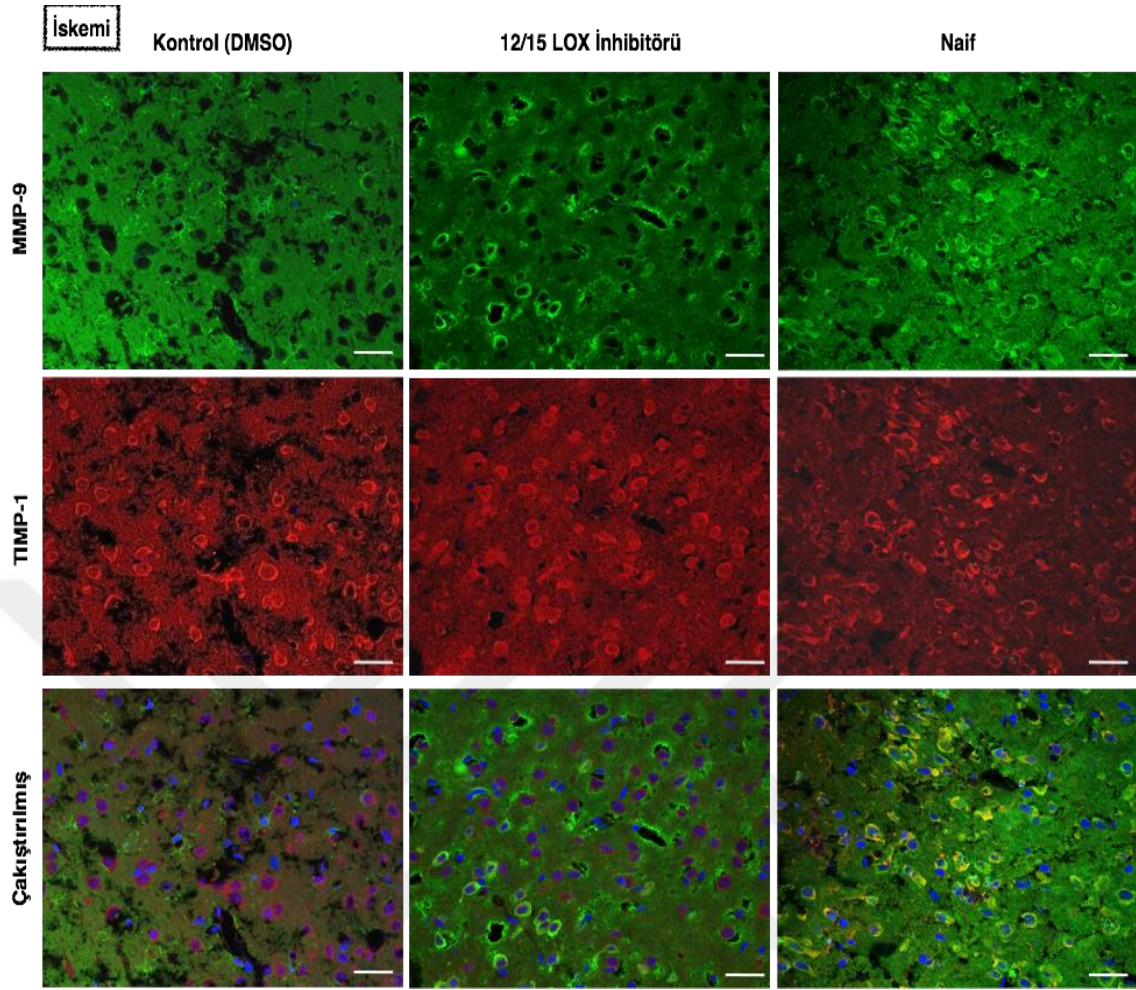
İskemi/rekanalizasyon uygulanan ve 24 saat sonra sakrifiye edilen gruplarda kontrol grubunda MMP-9 sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik ancak kalıcı iskemi grubunda olduğu gibi difüz ve çamurumsudur, yani hücreden salındığı düşünülmüştür (Şekil 4.57., sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (Şekil 4.57., sol sütun). Yani TIMP-1 ifadesi MMP-9 artışını kontrol edebilmek için artmıştır. Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi azalmıştır, bazı hücrelerin sitoplazmalarında ve uzantılarında ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.57., orta sütun). TIMP-1 sinyali naif örneğe ve kontrole göre azalmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (Şekil 4.57., orta sütun). Bu bulgulara dayanarak iskemi/rekanalizasyondan 24 saat sonra 12/15 LOX inhibitörü hem MMP-9 hem de TIMP-1 sinyalinin azalmasına neden olmuştur.



Şekil 4.57. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). Kontrol grubunda MMP-9 sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik ancak daha çok difüz ve çamurumsudur (Şekil 68, sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (Şekil 68, sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi azalmıştır, bazı hücrelerin sitoplazmalarında ve uzantılarında ifade edildiği görülmüştür (Şekil 68, orta sütun). TIMP-1 sinyali naif örneğe ve kontrole göre azalmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (Şekil 68, orta sütun).

Kalıcı iskemi modeli uygulanan ve 72 saat sonra sakrifiye edilen gruplardan kontrol grubunda MMP-9 sinyali naif örneğe göre azalmış, bazı hücrelerin sitoplazmasında kalmıştır (Şekil 4.58., sol sütun). MMP-9 işaretlenmesi genel şekilden farklılık göstermiştir. Mikrogliaların uzantılarına benzer bir işaretlenme mevcuttur. 72 saat iskemi modelinde mikrogliaların aşırı aktivasyonunu görmekteyiz

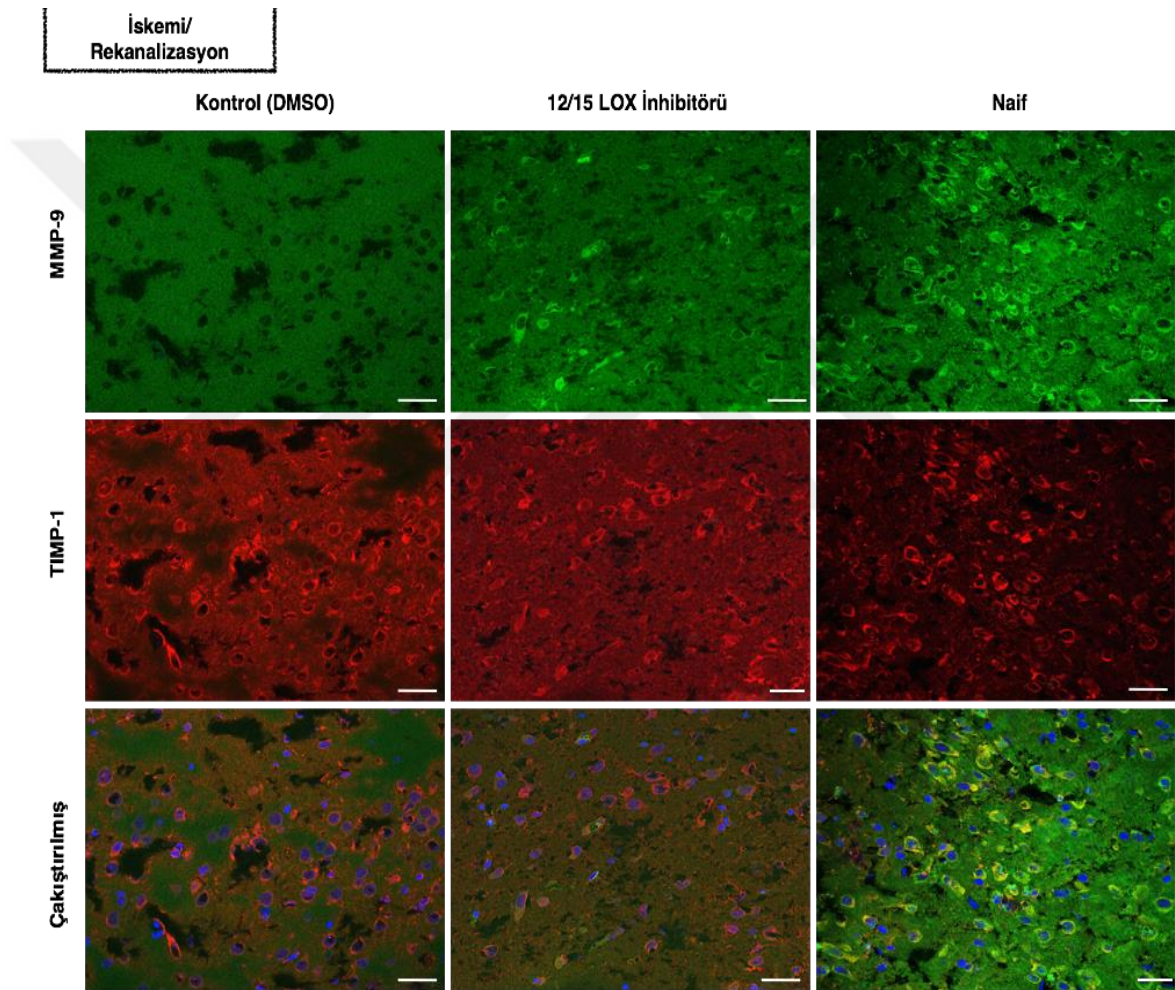
(Şekil 4.7). Bu işaretlenme şekli MMP-9'un geç dönemde mikrogliyal ifadesinin baskın hale gelmesinden kaynaklanabilir. Bu bulguyu doğrulamak için mikrogliyal belirteç ile MMP-9'un birlikte işaretlenmesi uygun olabilir. TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (Şekil 4.58., sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi hücre sitoplazmasında belirgindir ve sinyal naif örneğe benzemektedir (Şekil 4.58., orta sütun). TIMP-1 sinyali naif örneğe ve kontrole göre artmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (Şekil 4.58., orta sütun). Tedavi grubunda inflamatuvar aktivasyonun mikrogliyalarda da azaldığını fakat devam ettiğini görmüştük (Şekil 4.7). 72 saat iskemi modelinde mikrogliyal aktivasyon ve MMP-9 ile TIMP-1 işaretlenmesi birbirini desteklemektedir. 72 saat iskemi modelinde kan beyin bariyeri geçirgenliğinin kontrolünde mikrogliyaların aktif rol kazandığını söylenebilir.



Şekil 4.58. Kalıcı iskemi modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). Kontrol grubu örneğinde MMP-9 sinyali naif örneğe göre azalmış, bazı hücrelerin sitoplazmasında kalmıştır (sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi hücre sitoplazmasında belirgindir ve sinyal naif örneğe benzemektedir (orta sütun). TIMP-1 sinyali naif örneğe ve kontrole göre artmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (orta sütun).

İskemi/rekanalizasyon uygulanan ve 72 saat sonra sakrifiye edilen gruplardan kontrol grubunda MMP-9 sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik ancak kalıcı iskemi grubunda olduğu gibi difüz ve çamurumsudur, yani hücreden salınımının devam ettiği düşünülmüştür (Şekil 4.59., sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (Şekil

4.59., sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif örneğe azalmıştır, bazı hücrelerin sitoplazmalarında ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.59., orta sütun), ancak bu işaretlenme şekli naif örneğe benzemektedir, yani MMP-9 salınımı kontrole göre azalmıştır. TIMP-1 sinyali kontrole benzer şekilde artmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (Şekil 4.59., orta sütun). Bu bulgulara dayanarak iskemiden 72 saat sonra 12/15 LOX inhibitörünün MMP-9 salınımını azalttığı söylenebilir.

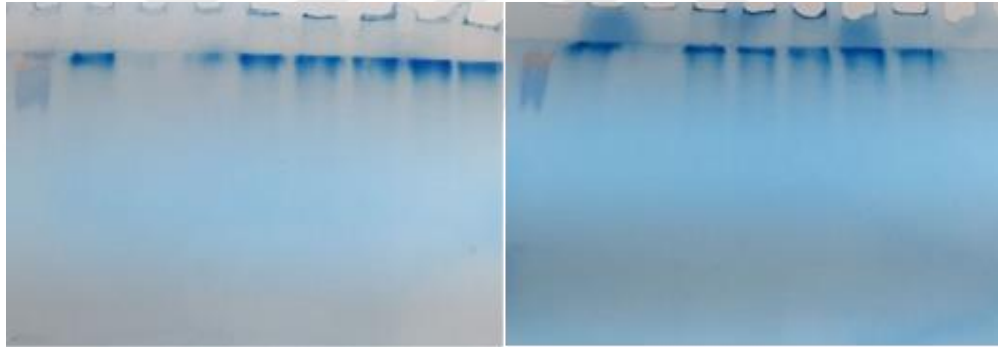


Şekil 4.59. İskemi/rekanalizasyon modeli oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında, MMP-9 ve inhibitör proteini TIMP-1'in konfokal mikroskop ile görüntülenmesi. En alt satırda aynı kesit üzerinde alınan TGF-beta ve IL-10 görüntüleri üst üste çakıştırılmıştır. Kontrol grubu farelere DMSO, tedavi grubu farelere 12/15 LOX inhibitörü (ip. 50 mg/kg) enjekte edilmiştir (40X büyütme, ölçek 25 µm). Kontrol grubu kesitinde MMP-9 sinyali bazı hücrelerde sitoplazmik daha çok difüz ve çamurumsudur (sol sütun). TIMP-1 sinyali kontrol grubunda naif örneğe göre artmıştır, hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada yer almaktadır (sol sütun). Tedavi grubunda ise MMP-9 işaretlenmesi naif örneğe azalmıştır, bazı hücrelerin

sitoplazmalarında ifade edildiği görülmüştür (orta sütun). TIMP-1 sinyali kontrole benzer şekilde artmıştır ve hem hücresel hem de sitoplazmik yerleşim göstermiştir (orta sütun).

4.9. Jelatin Zimografisi ile MMP-9 Aktivasyonunun Ölçülmesi

Matriksmetalloproteinazlar hücrelerarası matriks proteinlerini yıkan enzimlerdir. Nöroinflamasyon sürecinde kan beyin bariyeri geçirgenliğini arttırmaktadır (118). Çalışmamızda 12/15 LOX inhibisyonunun kan beyin bariyeri geçirgenliği üzerinde etkisini incelemek amacıyla perienfarkt alanda MMP-9 ve inhibitör proteini olan TIMP-1 proteinleri floresan ile işaretlenip, konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Enfarktlı beyin dokusunda MMP-9 aktivasyonunu incelemek amacıyla jelatin zimografisi yapılmıştır. Bunun için iskemi/rekanalizasyon modeli örnekleri ile çalışılmıştır. Fakat yöntemin elektroforez aşamasında örnekler ayrıştırıcı jele geçememiştir (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. Jelatinli zimografi jellerinde yürütülen proteinlerin görüntüsü.

Bunun için farklı yüzdelerde (%7.5, %10) ayrıştırıcı jel hazırlanmasına rağmen yöntem başarılı olmamıştır. Örnek miktarının kısıtlı olması nedeniyle optimizasyon çalışmalarına devam edilmemiştir. Yöntemin ticari zimografi jelleri ile daha iyi sonuç verebileceği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA

İnme hastalarında 12/15 LOX aktivasyonda artış olduğunun belirlenmesi, bilim insanlarını 12/15 LOX'un inme patafizyolojisinde etkin olup olmadığı yönünde araştırmalara yöneltmiştir (28). Yapılan çalışmalarda LOX inhibisyonunun iskemik beyinde enfarkt alanı, kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve ödem oluşumu gibi inmede ortaya çıkan patofizyolojik süreçleri baskılayarak etki ettiği görülmüştür (53,54). Buradan yola çıkarak, 12/15 LOX enzimine yönelik spesifik inhibitörler geliştirilmiştir. Bu inhibitörler arasında en yeni olanı, ML351 bileşiğidir, biyolojik sistemlerde kullanılabilir fizikokimyasal özelliklere ve yüksek seçiciliğe sahip bir bileşiktir. Bu tez çalışmasında 12/15 LOX inhibitörü olan ML351 bileşiğinin hem kalıcı iskemi hem de iskemi/rekanalizasyon deneysel modellerinde ortaya çıkan nöroinflamasyon üzerine etkisi olup olmadığı, etkisi varsa hangi moleküller üzerinden etki ettiği incelenmiştir. Ayrıca her iki model için de üç farklı zaman noktasında deneyler tekrarlanmış ve inmenin hiper-akut, akut ve sub-akut fazlarında ortaya çıkan inflamatuvar yanıt incelenmiştir. İki farklı iskemi modeli ile iki farklı doku hasarı oluşturulmuştur. Buna bağlı olarak inflamasyon süreci farklılık göstermiştir. Her iki durum için 12/15 LOX inhibisyonunun inflamasyon sürecini ne yönde ve hangi aşamada etkilediği saptanmaya çalışılmıştır.

Öncelikle deneylerde lipoksijenaz inhibitörü kullanılacağından kalıcı iskemi ve İ/R modeli uygulanan gruplarda lipid peroksidasyonunun şiddeti MDA ölçümü ile belirlenmiştir. Kalıcı iskemi modeli uygulanan 6, 24 ve 72 saat kontrol ve tedavi gruplarında MDA seviyesi naif gruba göre değişmemiştir. İ/R modeli uygulanan her üç zaman noktasında da kontrol gruplarında MDA naif gruba göre anlamlı olarak artarken, lipoksijenaz inhibitörü verilmesi ile lipid peroksidasyonu anlamlı olarak azaltmıştır. Bunun en temel nedeni iskemi/rekanalizasyon modelinde rekanalizasyonun etkisi ile oluşan oksidatif hasarın, kalıcı iskemi modeline göre daha şiddetli olmasıdır. Bu bulgu bize oksidatif hasarın değerlendirilmesinde kalıcı iskemi modelinin uygun bir model olmadığını göstermektedir.

Bilindiği gibi inflamasyon tehlike sinyallerine karşı dokunun kendini savunma mekanizmasıdır. Amaç hasarlı dokunun bütünlüğünü yeniden kazanması, hasarın sınırlandırılması ve ortadan kaldırılmasıdır. Beyinde bu rolü mikroglia hücreleri üstlenmektedir. Mikroglialar merkezi sinir sisteminde tanımlanmış doku

makrofajlardır. Fizyolojik koşullarda mikroglialar dinlenme halindedir. Ancak bu durum mikrogliaların inaktif olduğu anlamı taşımaz. Genellikle *ramified*, *intermediate*, *amoeboid* olmak üzere 3 farklı morfolojide bulunmaktadır (71). Dinlenme halinde morfolojileri *ramified* olarak karakterize edilmiştir. Bu morfolojik yapıyı sergileyen mikroglialarda makrofaj fonksiyonları ile ilişkili proteinlerin ekspresyonları düşüktür. Bu sayede dokuda meydana gelebilecek minör değişimlere ve tehlike sinyallerine karşı sürekli tetiktedirler. Uyarının kaynağı ve kimyasal yapısına bağlı olarak mikrogliaların morfolojisi değişkenlik göstermektedir (119). Bu bilgiler çalışmamızda oluşturulan kalıcı iskemi ve iskemi/rekanalizasyon modellerinde mikrogliaların aktivasyon durumunda, farklı morfolojik yapı sergilemelerini açıklamaktadır. Hasarın şiddeti ve türünden bağımsız olarak 12/15 LOX inhibisyonunun, mikroglia aktivasyonunu azalttığı ve azalmış fagositoz yeteneğini yeniden kazandırarak inflamasyon sürecinin, patolojik etkiye ulaşmadan sınırlanmasını sağladığı düşünülmüştür. Buna göre kalıcı iskemi modelinde inflamasyonun daha geç dönemde aktive olduğu ve daha uzun sürdüğü öne sürülebilir. Bu bilgidan yola çıkarak inme tedavisinde kullanılması planlanan anti-inflamatuvar tedavilerin ve lipoksijenaz inhibitörlerinin tedavi penceresi, hastanın inme tipine göre düzenlenebilir. Kalıcı iskemisi olan hastalarda anti-inflamatuvar tedaviler inmeden 72 saat sonrasına kadar verilebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda inflamasyon ile ilişkili moleküllerden bir diğeri de inflamazomlardır. İnflamazomlar inflamasyonun başlaması için gerekli olan sitozolik çoklu protein kompleksleridir. İnflamazom komplekslerinden NLRP1 daha çok nöronda, NLRP3 ise daha çok glial hücrelerde ve özellikle mikrogliada ifade edilmektedir (73). İnflamazom aktivasyonu hücrede proinflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesine ve salınmasına neden olur. Bu çalışmada NLRP1 ve NLRP3 inflamazom kompleksleri immünohistolojik işaretleme yöntemi ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre NLRP1 ve NLRP3 immünoaktivitesinin her üç zaman noktasında da kontrol ve tedavi grupları arasında farklı davrandığı saptanmıştır. Genel olarak 12/15 LOX inhibitörünün etkisi NLRP1 ve NLRP3'ü baskılamak yönünde olmuştur.

Bundan sonraki basamakta inflamazom kompleksleriyle aktive olan proinflamatuvar sitokinlerden IL-1beta, IL-6 ve TNF-alfa hem immünohistokimyasal yöntem hem de ELISA yöntemi ile incelenmiştir. İnflamatuvar süreçte mikroglia ve

makrofajlar tarafından salınan proinflatuvar sitokinler inflamasyonun gidişatı bakımından oldukça önemlidir. IL-6, IL-1beta ve TNF-alfa gibi sitokinler hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak inflamasyonu uyarır. Bu tez çalışmasında IL-1beta immünoreaktivitesi iskemiden sonra artarken, tedavi ile bu aktivitenin baskılandığı görülmüştür. ELISA sonuçları kalıcı iskemi modelinde bu değişiklik geç dönemde yani 72 saatte görülürken, İ/R modelinde 6 ve 24 saatte IL-1beta miktarı artmış ve bu artış kontrol ve tedavi grupları arasında farklılık göstermemiştir. IL-1betanın ELISA ile miktar tayini bakımından iskemi/rekanalizasyon modelinin daha iyi bir model olduğu söylenebilir. IL-6 immünoreaktivitesi kalıcı iskemi modelinde 6 ve 24. saatte artmış, tedavi ile baskılanmıştır. 72. saatte ise tedavi ile bir miktar artmıştır. ELISA sonuçlarında ise 6 ve 24. saatlerde IL-6 miktarı hem kontrol hem de tedavi ile anlamlı oranda artmıştır. İskeminin 72. saatinde ise IL-6 miktarı kontrol grubunda anlamlı artış gösterip, tedavi ile bu artış baskılanmıştır. IL-6 immünoreaktivitesi perienfarkt alanda 6 ve 24. saatlerde tedavi ile kontrole göre azalırken, ELISA ile elde edilen toplam doku yanıtında artış saptanmıştır. Literatürde IL-6'nın hem proinflatuvar hem de anti-inflatuvar role sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (120–122). Çalışmamızda ELISA ile elde ettiğimiz toplam doku yanıtında iskeminin erken döneminde kontrol gruplarında IL-6 miktarının naif dokuya göre az miktarda artış gösterip, tedavi sonucu IL-6 seviyesinin, aşırı artış göstermesi, IL-6'nın erken dönemde koruyucu rol üstlenmiş olabileceğini düşündürmektedir (6 ve 24 saat). 72. saatte yani inflamasyonun geç döneminde ise IL-6 miktarındaki artışın belirgin olması, proinflatuvar rolü üstlenmesine bağlı olarak tedavi ile bu etkinin azaltılmış olmasına bağlı olabilir.

İ/R modeli uygulandıktan 6 ve 72. Saat sonra kurban edilen kontrol grubu farelerin beyin dokularında, IL-6 işaretlenmesinin hücresel olmadığı görülmüştür. Hücresel işaretlenmenin olmaması IL-6'nın salınımından kaynaklanabilir. 2015 yılında Zhang ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada iskemi ile ilişkili olarak bozulan KBB geçirgenliği IL-6 salınımı ile ilişkilendirilmiştir. Plazmada ölçülen IL-6 miktarının ilk 6 saatte artıp, 24. saatte ise minimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (123). Çalışmamızda 24. saatte hücresel IL-6 işaretlenmesinin 6 ve 72. saat kontrol gruplarına göre arttığı saptanmıştır. IL-6'nın dokuda hücresel işaretlenmesi bu bulguyu destekler niteliktedir. Yani immünohistokimyasal analizlerde işaretlenmenin

hücresel olmayıp, çamurumsu bir görüntü sergilemesi hücre dışına salınma özelliği olan proteinlerin salındığına işaret edebilir. Buna göre 6 ve 72. saatte kontrol gruplarında salınımın olduğu görülürken, tedavi gruplarında ise işaretlenmenin hücrede lokalize olduğu yani 12/15 LOX inhibitörünün koruyucu etkisini gösterdiği düşünülmüştür. İ/R modelinde ELİSA ile saptanan IL-6 miktarı 6 ve 72 saatte gruplar arasında değişmezken, 24. saatte kontrolde anlamlı olarak artmış ve tedavi ile azalmıştır. TNF-alfa immünoaktivitesi kontrol gruplarında daha çok hücreden salıverilmeyi göstermiştir, tedavi ile ise sitoplazmada lokalize olmuş veya tüm hücrede salınmadan kalmıştır. ELISA yöntemi ile yapılan kantitatif incelemede ise TNF-alfanın kalıcı serebral iskeminin her üç zaman noktasında da indüklenmediği sonucuna varılmıştır. İ/R modelinde ise TNF-alfa miktarı sadece 24. saatte kontrolde naif beyne göre anlamlı olarak artmış ve tedavi ile baskılanmıştır. 12/15 LOX inhibisyonunun mikrogliya aktivasyonunu azaltarak bu proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltması, lipoksijenaz enziminin inflamasyon sürecinde oldukça etkin ve iyi bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir.

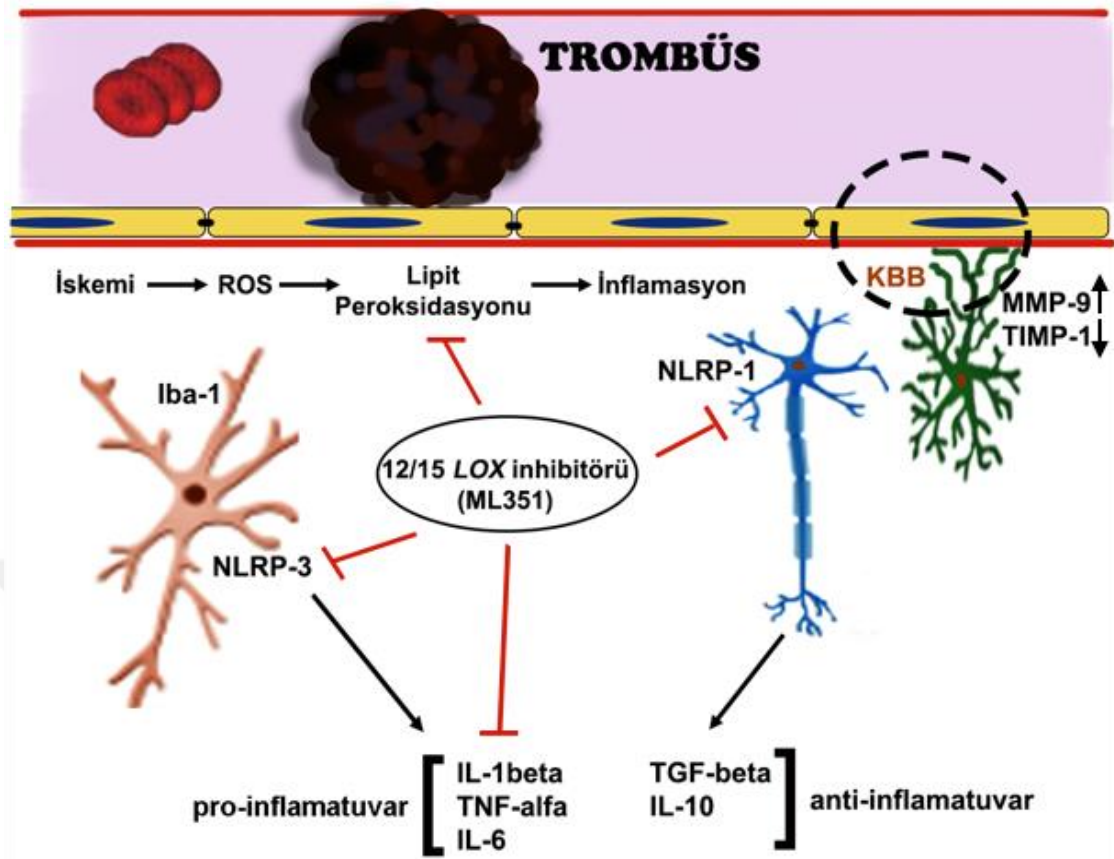
TGF-beta ve IL-10 doku hasarında birbirleriyle etkileşerek inflamasyonu baskılayıcı yönde etki etmektedir. Bu çalışmada bu iki sitokin immünohistokimyasal yöntemle incelenmiş ve birbirleri ile tamamlayıcı bir işaretlenme şekli sergiledikleri görülmüştür. Şöyle ki TGF-beta çekirdekte ifade edilirken aynı kesitte IL-10 sitoplazmada yer almıştır. Tedavi bu etkileşimi değiştirmemiştir. Kalıcı iskemi modelinde IL-10'un ELISA ile tayininde, her üç zaman noktasında da tedavi gruplarında naif beyne göre artış saptanmıştır. TGF-beta ise her üç zaman noktasında da kontrol ve tedavi gruplarında naif örneğe göre azalmış, 6 ve 24 saat tedavi gruplarında kontrole göre artış eğilimi saptanmıştır. İ/R modelinde ise IL-10, 24 saatte kontrol grubunda artarken tedavi grubunda daha da artmıştır. 72 saatte kontrolde değişmezken tedavi ile artış saptanmıştır. TGF-beta miktarı ise 6 ve 24 saat gruplarında değişmez iken, 72. saatte kontrolde azalan TGF-beta miktarı tedavi ile naif örnek seviyesine yükselmiştir. Yani anti-inflamatuvar IL-10 ise 24 ve 72 saatte tedavi ile naif örneğe göre artmış, TGF-beta ise 72. saatte yani geç dönemde tedavi ile artmıştır. Dolayısıyla iskemi modellerinde anti-inflamatuvar sitokin çalışılması açısından geç dönem daha uygun bir seçenek olabilir.

Bu çalışmada kullanılan immünohistokimyasal inceleme hasarı çevreleyen sağlıklı hücrelerin verdiği yanıtı göstermektedir. Böylece 12/15 LOX inhibisyonunun

sağlıklı hücreler üzerindeki koruyucu etkisi perienfarkt alanda görülmüş olmaktadır. ELISA yönteminde ise iskemik kor ve perienfarkt alan olmak üzere hasarlı dokunun tamamı alınmaktadır. Bu faktör iki yöntem arasındaki farklı bulgularımızı açıklayabilir. Bir diğer önemli faktör de kullanılan fare sayısının 3 ile sınırlı olması olabilir. Denek sayısını artırmak sonuçların istatistiksel açıdan anlamlılık kazanmasını sağlayabilir.

Son olarak her iki modelde kan beyin bariyeri geçirgenliği açısından MMP-9 ve TIMP-1 proteinleri incelenmiştir. MMP'ler inaktif latent enzim olarak sentezlenen ekstrasellüler matriks proteinlerini yıkan enzimlerdir. MMP-9 daha çok hücreden salınmış ve tedavi ile hücrede kalmaya zorlanmış izlenimi vermektedir. TIMP-1'de ise bu aktiviteyi baskılamak üzere hem kontrol hem de tedavi grubunda sitoplazmik ve artmış immünoreaktivite saptanmıştır. İ/R modeli kalıcı iskemi modelinden oldukça farklıdır. Bu modelde rekanalizasyonun etkisinden kaynaklanan ve reoksijenizasyon sonrası ortaya çıkan doku hasarı daha şiddetli ve yaygındır. Ayrıca KBB geçirgenliğinin artması sistemik dolaşımdan gelen makrofaj ve lenfositlerin dokuya erişimini sağlayarak, inflamasyon yanıtını güçlendirir. Makrofajlar klasik ve alternatif olmak üzere iki şekilde uyarılırlar. LPS gibi mikrobiyal ürünlerin makrofaj membranındaki TLR reseptörlerine bağlanması klasik aktivasyon olarak nitelendirilmektedir. Klasik aktivasyon ile makrofajlar tarafından TNF-alfa, IL-12 ve NO üretimi azalırken, IL-10 artmaktadır. Alternatif makrofaj aktivasyonunda ise hücre dışına salınmış olan sitokinler, makrofaj membranındaki reseptörüne bağlanarak, Arjinaz-1, mgl-1 ve TIMP-1 proteinlerini salgılar (74). Beklendiği gibi İ/R modelinde 1 saatlik kan akımının kesilmesinin ardından tekrar kanlanmanın olması ile beyin dokusu bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırısına açık hale gelir ve alternatif uyarım ile TIMP-1 sentezi artar. İ/R modelinde 24 ve 72. saatte 12/15 LOX inhibitörü verilen farelerde TIMP-1'in azaldığı MMP-9'un ise hücre dışına salınımının azaldığı görülmektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular ile 12/15 LOX inhibisyonunun her iki iskemi modelinde de kontrol grubunda artan kan beyin bariyeri geçirgenliğini azalttığını söyleyebiliriz.

Şekil 5.1'de bu tez çalışmasında incelenen moleküller ve birbirleriyle olan etkileşimleri şematize edilmiştir.



Şekil 5.1. Serebral iskemi ile inflamasyonun tetiklenmesi ve 12/15 LOX inhibisyonunun bu süreç üzerindeki etkisi. Orta serebral arterde tıkanıklık oluşmasının ardından gelişen serebral iskemi ile reaktif oksijen ürünleri (ROS) ortaya çıkmakta, hücre membranındaki araşidonik asitten lipoksijenazlar yolu ile lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonunun ve serebral iskeminin oluşturduğu diğer etkilerle dokuda inflamatuvar süreç tetiklenmektedir. Mikroglialar aktive olup, şekil değiştirmekte ve inflamazom kompleksi (NLRP3) aktive olmaktadır. Ayrıca nöronda da inflamazom kompleksi (NLRP1) aktifleşmektedir. Nöron, astrosit ve mikrogliada böylece inflamasyon süreci başlamakta ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezi artıp salınmaya başlamaktadır (IL-1beta, TNF-alfa, IL-6). Aynı zamanda doku kendini korumak üzere anti-inflamatuvar sitokin sentezini de başlatmaktadır (TGF-beta, IL-10). 12/15 LOX inhibitörü lipid peroksidasyonunu azaltmakta ve inflamazom aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler üzerinde inhibitor etki sağlarken, anti-inflamatuvar sitokinleri artırmaktadır. Ayrıca iskemi sonrası MMP-9 artarak kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırmakta, TIMP-1 ise bunu önlemeye çalışmaktadır. 12/15 LOX inhibitörü MMP-9'u baskılayıp, TIMP-1'i artırmaya çalışarak kan beyin bariyeri geçirgenliğini azaltmaktadır (Karatas-Kursun, H., Bodur, E. ve Taskiran, A., tarafından çizilmiştir).

Sonuç olarak, elde edilen tüm bu bulgular 12/15 LOX inhibisyonunun inflamatuvar süreç ile yakından ilişkili olup, inme gibi inflamasyonun tetiklendiği hastalıkların tedavisinde iyi bir hedef molekül olacağını göstermektedir. İskemi

sonrası mikrogial aktivasyondan başlayarak, iki farklı inflamazomun, üç farklı proinflamatuvar ve iki farklı anti-inflamatuvar sitokin ve kan beyin bariyeri hasarının iki farklı iskemi modelinde ve üç farklı zaman noktasında incelendiği ve bu parametrelerde lipoksijenaz inhibisyonunun etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu açılarından bu tez çalışması literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu kadar geniş kapsamlı olan bu çalışmanın sonuçlarından elde edilen önemli bilgiler ile bundan sonraki çalışmalarımızda daha sınırlı ve belirli molekülleri hedefleyen projeler üretilebilir.

Elde edilen sonuçlara göre serebral iskemi modelleri ile indüklenen inflamasyon çalışmalarında iskemi/rekanalizasyon modeli daha uygun bir model olabilir. Bu modelde 6 ve 24 saat arasında inflamatuvar belirteçler açısından belirgin farklılık yoktur. O nedenle İ/R sonrası 24 saat uygun bir seçim olabilir. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 en belirgin sonuçları vermiştir. Dolayısıyla daha sonraki çalışmalarda bu sitokinlerin tetiklediği alt yollara yönelik projeler üretilebilir. Literatürde distal OSA tıkaması ile oluşturulan kalıcı iskemi modelinde 12/15 LOX inhibitörü tedavisi ile enfarkt alanının küçüldüğü gösterilmiştir (124). Yani FeCl₃ OSA'nın tıkanıdığı kalıcı iskemi modeli inme tedavisinde ilaç taramaları için daha uygun bir model olabilir. Ayrıca kalıcı iskemi modelinde inflamasyonun daha geç dönemde aktive olduğu ve daha uzun sürdüğü öne sürülebilir. Bu bilgiden yola çıkarak inme tedavisinde kullanılması planlanan antiinflamatuvar tedavilerin ve lipoksijenaz inhibitörlerinin tedavi penceresi, hastanın inme tipine göre düzenlenebilir. İ/R hasta gruplarında 12/15 LOX inhibitörü tPA ile birlikte veya tek başına daha geç dönemde ve belki tekrarlanan dozlarda verilerek iskemi/rekanalizasyon sonrası ortaya çıkan inflamasyonun baskılanmasını sağlayabilir. Dolayısıyla 12/15 LOX inhibitörleri inme tedavisinde enfarkt hacmini azaltmasının yanında nöroinflamasyon üzerine olan etkileri ile yeni ve etkin bir tedavi ajanı olarak önerilebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında kalıcı iskemi ve iskemi/rekanalizasyon olmak üzere iki farklı inme modeli oluşturulmuştur. Bu iki modeli kullanarak inme sonrası oluşan inflamatuvar yanıt arasındaki farkı inceleyen ilk çalışmadır.
- Bu iki modelde inflamasyon gelişimi ve tedaviye verdikleri yanıt zamansal olarak 6, 24 ve 72. saatlerde incelenmiştir.
- Farklı analiz yöntemleri kullanılarak hem perienfarkt alanda hem de enfarktlı dokuda inflamatuvar yanıt incelenmiştir.
- İskemi/rekanalizasyon modeli uygulanan her üç zaman noktasında da lipid peroksidasyonu olduğu MDA tayini ile saptanmış, lipoksijenaz inhibitörü verilmesi ile lipid peroksidasyonu anlamlı olarak azalmıştır.
- Hasarın şiddeti ve türünden bağımsız olarak 12/15 LOX inhibisyonu, mikrogliya aktivasyonunu azaltmıştır.
- İskemi/rekanalizasyon modelinde her üç zaman noktasında da kontrol gruplarında artan proinflamatuvar IL-6 miktarı tedavi ile anlamlı olarak azalmıştır.
- İskemi/rekanalizasyon modelinde 6 ve 72 saatte kontrol gruplarında azalan antiinflamatuvar IL-10 miktarı tedavi ile anlamlı olarak artmıştır.
- 12/15 LOX inhibisyonu her iki iskemi modelinde de kontrol grubunda artan kan beyin bariyeri geçirgenliğini azaltmıştır.
- Serebral iskemi sonrası inflamasyon çalışmak için iskemi/rekanalizasyon modelinin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.
- İskemi/rekanalizasyon modelinde 6 ve 24 saat arasında inflamatuvar belirteçler açısından belirgin farklılık yoktur. Dolayısıyla İ/R sonrası 24 saat uygun bir seçim olabilir.
- Proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10 en belirgin sonuçları vermiştir. Dolayısıyla daha sonraki çalışmalarda bu sitokinlerin tetiklediği alt yollara yönelik projeler üretilebilir.
- 12/15 LOX inhibitörleri inme tedavisinde enfarkt hacmini azaltmasının yanında nöroinflamasyon üzerine olan etkileri ile tek başına veya tPA'ya adjuvan yeni ve etkin bir tedavi hedefi olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, et al. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med*. 2009;206(7):1565–74.
2. Yigitkanli K, Pekcec A, Karatas H, Pallast S, Mandeville E, Joshi N, et al. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Ann Neurol*. 2013;73(1):129–35.
3. Arnglim N, Schytz HW, Britze J, Amin FM, Vestergaard MB, Hougaard A, et al. Migraine induced by hypoxia: An MRI spectroscopy and angiography study. *Brain*. 2016;139(3):723–37.
4. Guadall A, Orriols M, Alcudia JF, Cachafeiro V, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C. Hypoxia-induced ROS signaling is required for LOX up-regulation in endothelial cells. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:955–67.
5. Xu J, Zhang Y, Xiao Y, Ma S, Liu Q, Dang S, et al. Inhibition of 12/15-lipoxygenase by baicalein induces microglia PPAR β/δ : a potential therapeutic role for CNS autoimmune disease. *Cell Death Dis*. 2013;4(4):e569.
6. Van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37(12):3014–8.
7. Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. Vol. 24, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004. p. 1542–8.
8. World Health Organization. The top 10 causes of death. *World Heal Organ*. 2011;2011(May):1.
9. World Health Organization. *World Health Statistics 2015*. World Health Organisation. 2015.
10. Adamson J, Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2004;13(4):171–7.
11. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches. *J Transl Med*. 2009;7:1–11.
12. Candelario-jalil E, Candelario-jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009; 10(7):644–54.
13. Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004; (35):2220–5.
14. Weinstein DS, Liu W, Ngu K, Langevine C, Combs DW, Zhuang S, et al. Discovery of selective imidazole-based inhibitors of mammalian 15-lipoxygenase: Highly potent against human enzyme within a cellular environment. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(18):5115–20.
15. Holman TR, Maloney DJ, Rai G, Yasgar A, Simeonov A, Jadhav A, et al. Potent and Selective Inhibitors of Human Reticulocyte 12/15- Lipoxygenase as Anti-Stroke Therapies. *J Med Chem*. 2014;57(10):4035–48.

16. Cimino M, Balduini W, Carloni S, Gelosa P, Guerrini U, Tremoli E, et al. Neuroprotective Effect of Simvastatin in Stroke: A Comparison Between Adult and Neonatal Rat Models of Cerebral Ischemia. 2005;26:929–33.
17. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1431–568.
18. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjö BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res.* 1992;89(1):67–78.
19. Kadhim HJ, Duchateau J, Sébire G. Cytokines and brain injury: Invited review. Vol. 23, *Journal of Intensive Care Medicine.* 2008. p. 236–49.
20. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, Van Der Worp HB, et al. Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2010; (30):1412–31.
21. Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(5):1122–6.
22. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391–401.
23. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine.* 2011; (11):796–808.
24. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends in Neurosciences.* 1999; (22):391–7.
25. Mattson MP, Culmsee C, Zai FY. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):173–87.
26. Martinon F. Detection of immune danger signals by NALP3. *J Leukoc Biol.* 2007;83(3):507–11.
27. Martin WJ, Walton M, Harper J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):281–9.
28. Matzinger P. Essay 1: The danger model in its historical context. *Scand J Immunol.* 2001;54(1–2):4–9.
29. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology.* 2010; (11):373–84.
30. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 2009;40(5):1849–57.
31. Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions. *Nat Neurosci.* 2011;14(11):1363–8.
32. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–8.

33. Waje-Andreassen U, Kråkenes J, Ulvestad E, Thomassen L, Myhr KM, Aarseth J, et al. IL-6: An early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2005;111(6):360–5.
34. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(5):654–65.
35. Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, et al. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem.* 2005;93(6):1616–22.
36. Mayadas T, Johnson R, Rayburn H, Hynes R, Wagner D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin - deficient mice. *Cell.* 1993;74:541–54.
37. Diacovo TG, DeFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1243–51.
38. Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-Induced Tolerance to Ischemic Injury Involves Differential Control of NF-kappaB Transactivation: The Role of NF-kappaB Association With p300 Adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(2):142–52.
39. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. Temporal profile of ischaemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci.* 1994;125(1):3–10.
40. Alikhani M, Alikhani Z, Raptis M, Graves DT. TNF-?? in vivo stimulates apoptosis in fibroblasts through caspase-8 activation and modulates the expression of pro-apoptotic genes. *J Cell Physiol.* 2004;201(3):341–8.
41. Zeng L, Liu J, Wang Y, Wang L, Weng S, Chen S, et al. Cocktail blood biomarkers: Prediction of clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke. *Eur Neurol.* 2013;69(2):68–75.
42. Boutin H, LeFeuvre R a, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci.* 2001;21(15):5528–34.
43. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, et al. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci.* 2000;12(7):2265–72.
44. Klempt ND, Sirimanne E, Gunn a J, Klempt M, Singh K, Williams C, et al. Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;13(1–2):93–101.
45. Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression. *Stroke.* 2001;32(2):544–52.
46. Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, et al. A

- Transforming Growth Factor- β Antagonist Unmasks the Neuroprotective Role of This Endogenous Cytokine in Excitotoxic and Ischemic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(12):1345–53.
47. Johnston RE, Dillon-Carter O, Freed WJ, Borlongan C V. Trophic factor secreting kidney cell lines: in vitro characterization and functional effects following transplantation in ischemic rats. *Brain Res.* 2001;900(2):268–76.
 48. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1164–71.
 49. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. Vol. 140, *Cell.* 2010;(140):918–34.
 50. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience.* 2001;(2):734–44.
 51. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nat Publ Gr.* 2014;15:1–14.
 52. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417–26.
 53. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology.* 2013;(13):397–411.
 54. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol.* 2008;9(8):857–65.
 55. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 2009;15(8):946–50.
 56. Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 2012;(3):132.
 57. Clarkson BDS, Ling C, Shi Y, Harris MG, Rayasam A, Sun D, et al. T cell–derived interleukin (IL)-21 promotes brain injury following stroke in mice. *J Exp Med.* 2014;211(4):595–604.
 58. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med.* 2011;364(7):656–65.
 59. Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS Journal.* 2009;(276):13–26.
 60. Kriz J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 2006;18(1–2):145–57.
 61. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(5):834–51.
 62. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase, a key

- enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2015;1851(4):331–9.
63. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: An update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68–69:433–55.
 64. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(7):332–41.
 65. Andreou A, Feussner I. Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 2009;70(13–14):1504–10.
 66. Upston JM, Neuzil J, Witting PK, Alleva R, Stocker R. Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, alpha-tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters. *J Biol Chem*. 1997;272(48):30067–74.
 67. Takahashi Y, Glasgow Wc, Suzuki H, Taketani Y, Yamamoto S, Anton M, et al. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. *Eur J Biochem*. 1993;218(1):165–71.
 68. Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett*. 1975;60(1):149–52.
 69. Van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature*. 1998;395(6700):392–5.
 70. Van Leyen K. Un-LOXing the door to organelle degradation. *Trends Cell Biol*. 1998;8(11):436.
 71. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;(67):181–98.
 72. Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem*. 2009;109:133–8.
 73. Hardingham GE, Lipton SA. Regulation of Neuronal Oxidative and Nitrosative Stress by Endogenous Protective Pathways and Disease Processes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1421–4.
 74. Jin G, Arai K, Murata Y, Wang S, Stins MF, Lo EH, et al. Protecting against cerebrovascular injury: Contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke*. 2008;39(9):2538–43.
 75. Haeggström JZ, Rinaldo-Matthis A, Wheelock CE, Wetterholm A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1).
 76. Tong WG, Ding XZ, Hennig R, Witt RC, Standop J, Pour PM, et al. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and

- induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3232–42.
77. O'Byrne PM, Israel E, Drazen JM. Antileukotrienes in the treatment of asthma. *Annals of Internal Medicine.* 1997;(127):472–80.
 78. Berger W, De Chandt MTM, Cairns CB. Zileuton: Clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. Vol. 61, *International Journal of Clinical Practice.* 2007. p. 663–76.
 79. Müller-Peddinghaus R. Potential anti-inflammatory effects of 5-lipoxygenase inhibition - Exemplified by the leukotriene synthesis inhibitor BAY X 1005. In: *Journal of Physiology and Pharmacology.* 1997. p. 529–36.
 80. Weinblatt ME, Kremer JM, Coblyn JS, Helfgott S, Maier AL, Petrillo G, et al. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1992;19(10):1537–41.
 81. Funk CD. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. Vol. 4, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2005. p. 664–72.
 82. Hedrick CC, Kim MD, Natarajan RD, Nadler JL. 12-Lipoxygenase products increase monocyte:endothelial interactions. *Adv Exp Med Biol.* 1999;469:455–60.
 83. Thomas CP, Morgan LT, Maskrey BH, Murphy RC, Kühn H, Hazen SL, et al. Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation. *J Biol Chem.* 2010;285(10):6891–903.
 84. Hussain H, Shornick LP, Shannon VR, Wilson JD, Funk CD, Pentland AP, et al. Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 1):C243-53.
 85. Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic J a, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261(1):218–23.
 86. Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. Vol. 111, *Chemical Reviews.* 2011. p. 5866–96.
 87. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;358(1):88–95.
 88. Succol F, Praticò D. A role for 12/15 lipoxygenase in the amyloid ?? precursor protein metabolism. *J Neurochem.* 2007;103(1):380–7.
 89. Gilmore JH. NIH Public Access. North. 2008;29(10):1883–9.
 90. O'Flaherty JT, Wooten RE, Samuel MP, Thomas MJ, Levine EA, Case LD, et al. Fatty Acid Metabolites in Rapidly Proliferating Breast Cancer. *PLoS One.* 2013;8(5).

91. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(6):664–76.
92. Serhan, Charles N. PNA. Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution Charles. *Chem Rev*. 2011;111(10):5922–43.
93. Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, Fukatsu-Sasaki K, Furutani N, Tada N. Neuroprotective effects of edaravone: A novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. Vol. 12, *CNS Drug Reviews*. 2006. p. 9–20.
94. Lee BJ, Egi Y, van Leyen K, Lo EH, Arai K. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro. *Brain Res*. 2010;1307:22–7.
95. Deschamps JD, Kenyon VA, Holman TR. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorganic Med Chem*. 2006;14(12):4295–301.
96. Rai G, Kenyon V, Jadhav A, Schultz L, Armstrong M, Jameson JB, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of human reticulocyte 15-lipoxygenase-1. *J Med Chem*. 2010;53(20):7392–404.
97. Sailer E-R, Schweizer S, Boden SE, Ammon HPT, Safayhi H. Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem*. 1998;256(2):364–8.
98. Whitman S, Gezginci M, Timmermann BN, Holman TR. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. *J Med Chem*. 2002;45(12):2659–61.
99. Kenyon V, Chorny I, Carvajal WJ, Holman TR, Jacobson MP. Novel human lipoxygenase inhibitors discovered using virtual screening with homology models. *J Med Chem*. 2006;49(4):1356–63.
100. Weinstein DS, Liu W, Gu Z, Langevine C, Ngu K, Fadnis L, et al. Tryptamine and homotryptamine-based sulfonamides as potent and selective inhibitors of 15-lipoxygenase. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2005;15(5):1435–40.
101. Park SY, Marasini S, Kim GH, Ku T, Choi C, Park MY, et al. A method for generate a mouse model of stroke: evaluation of parameters for blood flow, behavior, and survival. *Exp Neurobiol*. 2014;23(1):104–14.
102. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Soylemezoglu F, Dunn AK, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl 3 application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;318(10):1452–60.
103. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472–6.
104. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3445–54.

105. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005;38(1):73–83.
106. Kleiner DE, Stetlerstevenson WG. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem*. 1994;218(2):325–9.
107. Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. Vol. 142, *Progress in Neurobiology*. 2016. p. 23–44.
108. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes. *PLoS One*. 2015;10(6):1–19.
109. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: Inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(3):464–79.
110. Gahring L, Carlson N, Kulmer R, Rogers S. Neuronal Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha in the Murine Brain. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3:289–303.
111. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor Necrosis Factor- α . *Stroke*. 1997 Jun 1;28(6):1233 LP-1244.
112. Zaremba J, Losy J. Early TNF- α levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol Scand*. 2001;104(5):288–95.
113. Norden DM, Fenn AM, Dugan A, Godbout JP. TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*. 2014;62(6):881–95.
114. Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased Expression of TGF- β 1 in Brain Tissue After Ischemic Stroke in Humans. *Stroke*. 1996;27(5):852–7.
115. Buisson A, Lesne S, Docagne F, Ali C, Nicole O, MacKenzie ET, et al. Transforming growth factor- β and ischemic brain injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(4–5):539–50.
116. Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, Leonard A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2013;4(32):1–15.
117. Fujimoto M, Takagi Y, Aoki T, Hayase M, Marumo T, Gomi M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(10):1674–85.
118. Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. Vol. 36, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016. p. 1481–507.
119. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial M1/M2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals*. 2014;7(12):1028–48.

120. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, et al. Lack of Interleukin-6 Expression Is Not Protective Against Focal Central Nervous System Ischemia Editorial Comment. *Stroke*. 2000;31(7):1715–20.
121. Smith CJ, Emsley HCA, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*. 2004;4:1–8.
122. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(4):406–15.
123. Zhang J, Sadowska GB, Chen X, Park SY, Kim JE, Bodge CA, et al. Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus. *FASEB J*. 2015;29(5):1739–53.
124. Liu Y, Zheng Y, Karatas H, Wang X, Foerch C, Lo EH, et al. 2/15-LOX inhibition or knockout reduces warfarin-associated hemorrhagic transformation following experimental stroke.

Ek-1: Etik Kurul İzin Belgesi

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 -57

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 07.06.2016 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2016/04
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2016/27
KARAR NUMARASI	: 2016/27 – 04
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN, Doç. Dr. Ebru BODUR ve Canan Çakır AKTAŞ
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: -
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 183 Swiss Albino Erkek

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN'un araştırma yürütücüsü olduğu 2016/27 kayıt numaralı **"Serebral İskemi Modelinde Oluşan Nöroinflamasyon Üzerine 12/15 Lipooksijenaz İnhibitörlerinin Etkisi"** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.


 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
 Etik Kurul Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında “nNav1.5 sodyum kanalı ve Noç-4 reseptör sinyalinin baskılanmasının insan meme kanseri hücrelerinde çoğalma ve metastatik potansiyeli üzerindeki etkisinin incelenmesi” başlıklı tez çalışmamı 2013 yılında tamamladım. Şu an aynı bölümde Biyokimya doktora eğitimime devam etmekteyim. Doktora tez çalışmam “Serebral iskemi modelinde oluşan nöroinflamasyon üzerine 12/15 lipooksijenaz enzim inhibitörlerinin etkisi” üzerinedir.

2011 yılından itibaren görev aldığım çeşitli projeler kapsamında ve tez çalışmalarım esnasında in vitro kanser hücrelerinin migrasyonu, görüntülenmesi ve organotipik kesit kültürlerinde travma modeli oluşturarak, geliştirilen yeni formülasyonların doz-cevap ilişkilerinin incelenmesi üzerine çalışmalar yaptım. Farede travma ve iskemi modelleri (kalıcı iskemi & iskemi/rekanalizasyon) oluşturarak beyin dokusunda proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar süreçte görevli sitokinlerin immünohistolojik analiz yöntemleri ile görüntülenmesi, western blotlama, ELISA ve RT-qPCR ile hem transkripsiyon hem de protein düzeyinde kantitatif analizleri üzerinde çalıştım. Ayrıca oksidatif stres çalışmalarında miyeloperoksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivite tayinleri üzerinde çalışmalarda bulundum.

Görev Aldığım Projeler

- Fare Kafa Travması Modelinde Deksmetomidinin İnflamasyon Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi-Hızlı Destek. (Yürütücü: Prof. Dr. Melike Mut Aşkun, **Araştırmacı**) 13.12.2017-Devam Ediyor.
- Glioblastoma multiforme için ekstraselüler vezikül/serum-tabanlı tümör biyomarker tarama çalışmaları, TÜBİTAK-SBAG, 216S572. (Yürütücü: Prof. Dr. Melike Mut Aşkun, **Bursiyer**) 15/10/2017- Devam Ediyor.
- Nöroprotektif Etkin Madde İçeren Nano-Formülasyonların Geliştirilmesi Ve Periferik Sinir Hasarı Modelinde Etkinliklerinin Değerlendirilmesi.

TÜBİTAK –SBAG, 115S202. (Yürütücü: Doç. Dr. Hakan Eroğlu, **Bursiyer**)
01.10.2015- Devam Ediyor.

- Farelerde ağrıya bağlı yüz ifadesinin otomatik değerlendirilmesi (Fare Mimik). TÜBİTAK-SBAG, 115E248. (Yürütücü: Prof. Dr. Uğur Halıcı, **Bursiyer**) 15.10.2015- Devam Ediyor.
- Serebral İskemi Modelinde Oluşan Nöroinflamasyon Üzerine 12/15 Lipooksijenaz İnhibitörlerinin Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi- Hızlı Destek. (Yürütücü: Doç. Dr. Hülya Karataş Kurşun, **Araştırmacı**) 11.08.2017-Tamamlandı.
- Lipopolisakkaritle oluşturulan nöroinflamasyon modelinde proinflamatuvar sitokinlerin ve yolaklarının glia limitans üzerine etkileri. TÜBİTAK-SBAG, 113S266. (Yürütücü: Doç.Dr. İlkan Tatar, **Bursiyer**). 2015- Tamamlandı.
- Tümör Hücre Hatlarına Plazmid DNA ve Antisense Oligonükleotid Aktarımı ve Görüntüleme için Akıllı İnorganik Nanopartikül Tasarım ve Üretimi. TÜBİTAK-MAM,111M216 (Yürütücü: Prof. Dr. Tülin Kutsal, **Bursiyer**). 01-11-2013-Tamamlandı.

Bildiri ve Yayınlarım

Canan Cakir Aktas, N. Dilara Zeybek , A. Kevser Piskin. Effects of Phenytoin and DAPT on the metastatic behaviour of MDA-MB-231 breast cancer cells. Acta Biochemica et Biophysica, Acta Biochim Biophys Sin, 2015, 47(9), 680–686.

Seda Atay, Kevser Pişkin, Fatma Yılmaz, **Canan Çakır**, Handan Yavuz and Adil Denizli. Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors, Anal. Methods, 2016, 8, 153-161.

C. Çakır Aktaş, M. Yemisci, E. Bodur, E. Eren Koçak, K. V.Leyen, T. Dalkara & H. Karataş Kurşun, 12/15 Lipoxygenase Inhibition Suppresses Neuroinflammation In A Thrombotic Permanent Cerebral Ischemia Model, Poster Sunumu, World Congress Of Neurology, 16 Eylül 2017, 21 Eylül 2017.

Canan Çakır Aktaş, Müge Yemişçi, Ebru Bodur, Emine Eren Koçak, Klaus Van Leyen, Turgay Dalkara, Hülya Karataş Kurşun. Effects of lipoxxygenase inhibition on neuroinflammation induced by acute transient cerebral ischemia/recanalization. Türkiye, 15. Sinir Bilim Kongresi, 2017.

Canan Çakır Aktaş, Müslüm Gök, Ebru Bodur. Establishment of an organotypical spinal cord slice culture. Türkiye, 15. Sinir Bilim Kongresi, 2017.

M. Eral, **C. Çakır Aktaş**, E. Eren Koçak, T. Dalkara & U. Halici, Fare Yüzü Görüntülerinde Ağrı Derecelendirilmesi, Poster Sunumu, Xx. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Biyomut, 03 Kasım 2016, 05 Kasım 2016.

C. Çakır Aktaş, Gold-Nanoparticles For Specific Targeting And Delivery Of Oligonucleotides To Human Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, Biomed, 23 Ağustos 2014.

C. Çakır Aktaş, Transferrin Receptor Targeted Antisense Oligonucleotide Delivery To Metastatic Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, Mechanisms in Biology, 06 Temmuz, 2013.