



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YAŞLI VE GENÇ FARELERİN BEYİN FELCİ SONRASI
PROTEİN EKSPRESYON PROFİLİ**

AYSUN DİLDEN

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2018



*“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Çalışma disipliniyle bana ilham veren, bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, huzurlu çalışma ortamımızın en önemli mimarı saygıdeğer danışman hocam sayın Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a bilim yolunda ilerlerken beni teşvik ettiği, tecrübesini paylaştığı ve her daim desteklediği için teşekkürü bir borç bilirim. Bize her zaman açık olan kapısıyla, güler yüzü ve samimiyetiyle bilimsel konularda bize rehberlik etmesinin yanı sıra, bir abi gibi bizi dinlediği ve hayatta yalnız olmadığımızı hissettirdiği için en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Değerli tez jüri üyelerim Prof. Dr. Gürkan Öztürk ve Prof. Dr. Bayram Yılmaz'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimle ve diğer bilimsel çalışmalarım ile ilgili her zaman destek veren, hiçbir sorumu geri çevirmeden bana yardımcı olan başta Ahmet Burak Çağlayan ve Mustafa Çağlar Beker olmak üzere çalışma arkadaşlarım Berrak Çağlayan, Esra Yalçın ve Taha Keleştemur'a verdikleri güven duygusu için teşekkür ederim. Gerçek bir ekibin parçası olduğumu hissettiren, laboratuvarı evim olarak görmemi sağlayan, çoğu zaman dirsek dirseğe çalıştığımız, desteğe ihtiyacım olduğunda söylememe bile gerek kalmadan yanımda olan Elif Sertel ve Reyda Karaçay'a, ekibe dahil olduğum ilk zamanlarda yabancılık çekmememi sağlayan, bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Serdar Altunay ve Arman Dalay'a, yanımda olduğunu bildiğim Zeynep Balçıkanlı'ya, ekibimize yeni katılan ve güzel enerjisiyle bize yardımcı olan Nilay Ateş'e, bitmeyen enerjisiyle Mehmet Özgen Altıntaş'a gönülden teşekkür ederim.

Başta Hilmi Kaan Alkan olmak üzere İstanbul Medipol Üniversitesi REMER ailesine; Ali Şenbahçe ve Musa Ekrem Özdemir'in de dahil olduğu MEDİTAM ailesine çalışmalarımızın sorunsuz ilerlemesine katkıda bulundukları için teşekkür etmek isterim.

Hayat sürüp giderken karşıma çıkan zorlukları onlardan aldığım destekle aşmamın yanında, deneylerimi yaparken ve tezimi yazarken, beni destekleyen,

moralimi yüksek tutan, onlara sahip olduğum için her zaman şanslı olduğumu hissettiğim, aynı zamanda meslektaşlarım olan sevgili dostlarım Kaya İşleyen, Reyhan Zeynep Gündoğdu ve Şilan Coşkun’a teşekkürlerimi iletmek isterim.

Son olarak beni hayata hazırlayan, hiçbir karşılık beklemeden hoşgörü ve sevgileriyle beni bugüne getiren, daha da önemlisi bu yolda ilerlerken başaracağıma her zaman inanan sevgili aileme teşekkür ederim. Şu an aramızda olmayan ancak son anına kadar başarımdan hiç şüphe duymayan büyükbabam Abdi Dilden’e, desteklerini doğduğum günden beri hissettiğim, ilk öğretmenim olan babam Hüseyin Dilden’e, sevgisiyle hayatımı güzelleştiren annem Öznur Dilden’e ve canım kardeşim Aycan Dilden’e en derin teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI FORMU	I
BEYAN.....	II
İTHAF	III
TEŞEKKÜR.....	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XII
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İskemik Beyin Felci	5
4.2. İskemik Beyin Felci Patofizyolojisi.....	5
4.2.1. Glutamat birikimi ve ekzitotoksisite	6
4.2.2. Kalsiyum birikimi ve oksidatif stres	6
4.2.3. Endoplazmik retikulum stresi	7
4.2.4. Enflamasyon	8
4.2.5. Peri-infarkt depolarizasyonu ve yayılan depresyon	8
4.3. İskemik Beyin Felcini Tedavi Etmeye Yönelik Yaklaşımlar	9
4.4. Klinik Tedavi Çalışmalarının Başarısız Olma Nedenleri.....	10
4.5. Yaşlanma	11
4.5.1. Yaşlanma ile ilgili hücrel ve moleküler mekanizmalar.....	12
4.5.2. Yaşlanma sürecinde beyin	13
4.5.3. Yaşlanmaya bağlı sık görülen hastalıklar	15
4.6. İskemik Beyin Felcine Karşı Geliştirilen Yanıtlar.....	15

5. MATERİYAL VE METOT	17
5.1. Deney Dizaynı ve Gruplar	17
5.2. Orta Serebral Arter Oklüzyonu ve Reperfüzyon	18
5.3. Beyin Kesitlerinin Alınması ve Örnek Toplama	19
5.4. <i>Cresyl Violet</i> Boyaması ile Hasar Analizi	19
5.5. TUNEL Boyaması ile DNA Fragmentasyon Analizi	20
5.6. İskemik Striatumda NeuN Boyaması ve Nöronal Sağkalım Analizi	21
5.7. IgG Boyaması ve Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliği	22
5.8. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/ MS) Analizi için Örnek Hazırlama	22
5.8.1. Protein izolasyonu	22
5.8.2. Protein konsantrasyonu ölçümü	23
5.8.3. Filtre destekli örnek hazırlama (FASP) ile triptik peptidlerin eldesi	23
5.8.4. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/ MS) analizi ve veri işleme	24
5.8.5. Farklılık gösteren proteinlerin sinyal yolağı analizi	25
5.9. İstatistiksel Analiz	25
6. BULGULAR	26
6.1. Laser Doppler Flowmetrisi ile Serebral Kan Akımının Ölçülmesi	26
6.2. <i>Cresyl Violet</i> Boyaması ile Hasar Alanının Belirlenmesi	27
6.3. DNA Fragmentasyon Analizi ile Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi	29
6.4. Nöronal Sağkalım Analizi	30
6.5. IgG Boyaması ile Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi	31
6.6. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/ MS) ile Proteinlerin Tanımlanması	32
6.7. Sinyal yolağı analizi	34
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
8. KAYNAKLAR	56
9. ETİK KURUL ONAYI	65

10. ÖZGEÇMİŞ	66
---------------------------	-----------



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACN	Asetonitril
AHA	Amerikan Kalp Birliği
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenozin trifosfat
Ca ⁺²	Kalsiyum
Cl ⁻	Klor
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Di- Metil Sülf-Oksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ER	Endoplazmik Retikulum
FA	Formik Asit
FASP	Filtre Destekli Örnek Hazırlama Protokülü
FDA	Amerikan Fedaral Gıda ve İlaç İdaresi
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IMS	İyon Hareketlilik Ayrımı
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K ⁺	Potasyum
LC	Sıvı Kromatografisi
LDF	Laser Doppler flowmetri
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MS	Kütle Spektrometresi
Na ⁺	Sodyum
NeuN	Nöronal Nukleus
NF κ B	Nukleer Faktör Kappa B
NGS	Normal keçi serumu

NIH	Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik Oksit
OSA	Orta serebral arter
OSAt	Orta Serebral Arter tıkanması
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PFA	Paraformaldehit
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
rt-PA	Rekombinant doku plazminojen aktivatörü
SD	Sprague Dawley Sıçan
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
t-PA	Doku plazminojen aktivatörü
TUNEL	Terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
UPX	Universal Protein Ekstraksiyonu

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 5.1.1. Deney dizaynı	17
Şekil 6.1.1. Laser Doppler kaydı	26
Şekil 6.2.1. Hasar hacminin değerlendirilmesi	27
Şekil 6.2.2. Ödemin değerlendirilmesi	28
Şekil 6.3.1. Yaşlı ve genç farelerde iskemik beyin felci sonrası apoptotik hücre sayısı	29
Şekil 6.4.1. Nöronal sağkalımın değerlendirilmesi	30
Şekil 6.5.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi.....	31
Şekil 6.7.1. İskemi sonrası uzun süreli depresyonla ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	35
Şekil 6.7.2. İskemi sonrası nitrik oksit sentezi ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	36
Şekil 6.7.3. İskemi sonrası nöbet geçirme ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	37
Şekil 6.7.4. İskemi sonrası hareket kabiliyeti ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	38
Şekil 6.7.5. İskemi sonrası kas hücresi ölümü ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	39
Şekil 6.7.6. İskemi sonrası hücresel uzantıların oluşumu ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	40
Şekil 6.7.7. İskemi sonrası apoptotik kas hücresi ölümü ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	41
Şekil 6.7.8. İskemi sonrası davranış ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	42
Şekil 6.7.9. İskemi sonrası mikrotübül dinamiği ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	43
Şekil 6.7.10. İskemi sonrası hücre iskeleti organizasyonu ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	44
Şekil 6.7.11. İskemi sonrası uzun süreli potansiyel artışı ilgili anlamlı olarak değişen proteinler	45

Şekil 6.7.12. İskemi sonrası hareket bozuklukları ilgili anlamlı olarak değişen proteinler46

Şekil 6.7.13. İskemi sonrası koordinasyon ilgili anlamlı olarak değişen proteinler47



TABLÖLARIN LİSTESİ

Tablo 5.1.1. Kullanılan deney grupları.....	18
Tablo 6.1.1. Yaşlı ve genç hayvanların iskemik striatumlarında istatistiksel olarak anlamlı değişen proteinlerin listesi	33



1. ÖZET

YAŞLI VE GENÇ FARELERİN BEYİN FELCİ SONRASI PROTEİN EKSPRESYON PROFİLİ

Beyin felci, dünyada yaygın görülen bir dolaşım sistemi hastalığıdır. Beyni besleyen damarlarda oluşan tıkanma ya da yırtılma ile kan akışının değişmesi sonucunda gelişen patolojik olaylar beyin felcine yol açmaktadır. Beyin felci görülme oranı 65 yaş ve üzerinde oldukça yüksek olduğu için yaşlanma beyin felci için bir risk faktörüdür. İskemik beyin felci görülme sıklığı yaşla birlikte artsa da araştırmalarda kullanılan deney grupları genellikle genç hayvanlardan seçilmektedir. Yaşlı ve genç beyinler arasındaki fizyolojik farkların, geliştirilmeye çalışılan tedavilerin ve bu tedavilerin kliniğe uyarlanması başarısızlığına neden olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda beyin felcinin patofizyolojisinin yaşlı ve genç beyin arasında göstermiş olabileceği farklılıkların incelenmesi, hasarla ilgili mekanizmaların anlaşılması ve buna yönelik ilaçlar geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu tezde yaşlı ve genç farelerde orta serebral arter tıkanması metodu kullanılarak serebral iskemi indüklenmiştir. İskemi sonrası yaşlı ve genç farelerin striatum dokularında nöronal sağkalımın, hasar hacminin, apoptotik hücre sayısının ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ek olarak, deney grupları arasında iskemi sonrası protein profili farklılıklarını ortaya koymak adına sıvı kromatografisi kütle spektrometresi ile geniş ölçekli protein profili analizi yapılmıştır. Gruplar arası farklılık gösteren proteinlere sinyal yolağı analizi yapılmış ve bu yolların hangi mekanizmalarla ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda genç farelerle kıyaslandığında yaşlı farelerin striatumlarında, iskemi sonrası daha az hasar geliştiği, nöronal sağkalımın daha fazla olduğu, ancak daha fazla apoptotik hücre olduğu görülmüştür. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinde ise yaşlı ve genç fareler arasında bir fark görülmemiştir. Protein profili analiziyle tanımlanan proteinlerin hasar gelişimi, apoptoz ve nöronal sağkalımda rolü olduğu düşünülmektedir. Bu proteinlerin detaylı incelenmesi ile ilişkilendirildikleri hedef mekanizmalar, klinik tedavi için geliştirilecek yeni hedef moleküllerin bulunmasında önemli rol oynayacaktır.

Anahtar Kelimeler: İskemik beyin felci, OSAt, Proteomiks, Serebral iskemi, Yaşlı ve genç fareler

2. ABSTRACT

THE PROTEIN EXPRESSION PROFILE OF OLD AND YOUNG MICE AFTER CEREBRAL ISCHEMIA

Cerebral ischemia is a well-known circulatory system disorder that generally occurs in consequence of pathological conditions such as a rupture or a blockage within the blood vessels supplying the brain. Aging is accepted as a risk factor especially in the elderly population over the age of 65. Even though the incidence of cerebral ischemia increases with age, the study groups are mostly chosen from young animals. It is now considered that the physiological differences between the aged and the young animals lead to the failure of development and clinical adaptation of these treatments. In the scope of this knowledge, elucidation of the mechanisms and pathophysiological differences of cerebral ischemia between young and aged animals and drug development with these considerations have become important. In the present thesis study, a cerebral ischemia model has been applied using middle cerebral artery (MCA) occlusion in young and aged animals. The studies focused on the comparison of neuronal survival, the size of infarct area and the number of apoptotic cells in the striatal tissues after the cerebral ischemia. Additionally, liquid chromatography-mass spectrometry was applied to reveal the differences of the protein profiles between the study groups. The differential proteins between the groups were identified and signaling pathway network analyses were performed to find out related mechanisms. According to the results, it was observed that the striatum of aged animals showed less infarct area with higher apoptotic cell number and neuronal survival at 72 hours post-ischemia when compared with young animals. The identified proteins from the protein profile analysis are thought to contribute to the apoptosis, neuronal survival and infarct development. The detailed investigation of these proteins and the correlation between their target mechanisms can reveal new target molecules to be used for development of clinical treatments.

Key words: Cerebral ischemia, MCAo, Proteomics, young and aged animals

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin felci, ölüm oranı yüksek olan bir dolaşım sistemi hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında en önde gelen ölüm sebebi olarak dolaşım sistemi hastalıklarını işaret etmektedir (1). 2015 yılında dünya çapında neredeyse 18 milyon kişi dolaşım sistemi hastalıkları (kardiyo-vasküler hastalıklar) nedeniyle hayatını kaybetmiştir (2). Bu sayının 7 milyona yakınında ise serebrovasküler bir hastalık olan beyin felci sorumludur. Amerikan Kalp Birliği (AHA) verilerine göre dünya nüfusunun önemli bir kısmını oluşturan Amerika'da yılda yaklaşık olarak 800.000 kişinin beyin felci geçirdiği bilinmektedir. Yine yalnızca Amerika'da 20 ölümden birinin sorumlusu beyin felcidir (2). Türkiye'de de durum benzerdir. Türkiye İstatistik Kurumu 2016 yılı ölüm sebepleri arasında ilk sırada gelen ölüm sebebi olarak dolaşım sistemi hastalıklarını kayda geçirmiştir. Ölüme sebebiyet veren dolaşım sistemi hastalıklarının ise %23,6'sı serebrovasküler hastalıklar kaynaklıdır. Bütün bu istatistiksel verilerin yanı sıra beyin felci geçiren ve hayatta kalmayı başaran hastaların birçoğunun nörolojik, motor ve psikolojik aktiviteleri yerine getiremedikleri, yaşamlarını bakıma muhtaç bir şekilde devam ettirmek zorunda kaldıkları bilinmektedir (3). Beyin felci, sonrasında tedavi, bakım ve hasta ihtiyaçları düşünüldüğünde hem ülke ekonomisi hem de hasta için oldukça maliyetli bir hastalıktır (4). Ancak yakalanma sıklığı, ölüm oranı ve maliyeti bu denli yüksek olan beyin felcinin klinikte kullanılabilen tek tedavisi oluşan pıhtıyı çözmeyi hedefleyen doku plazminojen aktivatörüdür (tPA). tPA beyin felcinin tetiklenmesinden itibaren ilk 3-4,5 saat içerisinde kullanıldığında etkili bir tedavi yöntemidir, sonrasında ise toksik olduğu bilinmektedir. Bu sebeple hastaların büyük çoğunluğu bu tedavi yönteminden faydalanamamaktadır (5). Klinik öncesi çalışmalarla nöroprotektif olduğu öngörülmüş bir takım ajanların klinik uygulamalarının başarısızlıkla sonuçlandığı bilinmektedir. Klinikte beyin felci görülen vakaların %80'ini 65 yaş ve üstü bireyler oluşturmalarına rağmen literatürde yapılan birçok *in-vivo* çalışma genç deney hayvanları kullanılarak yapılmaktadır. Geliştirilmeye çalışılan tedavilerin başarısızlıkla sonuçlanmasının ve kliniğe uyarlanamamasının nedenlerinden birinin de yaşlı ve genç beyinler arasındaki fizyolojik farklılıklar olabileceği düşünülmektedir (6). Bu bilgiler doğrultusunda beyin felci patofizyolojisinin yaşlı ve genç beyin

arasında göstermiş olabileceği farklılıkların incelenmesi, mekanizmaların anlaşılması ve buna yönelik ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu tezde yaşlı ve genç deney hayvanlarında orta serebral arter (OSA) tıkanması metodu kullanılarak serebral iskemi indüklenen farelerin iskemik striatumlarının i) nöronal sağkalım, ii) hasar alanı büyüklüğü, iii) apoptotik hücre sayısı, iv) kan beyin bariyeri geçirgenliği ve v) protein profilleri bakımından farklılıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. İskemik Beyin Felci

Beyin felci kalıcı veya geçici olarak beyni besleyen damarlarda görülen tıkanma ya da yırtılma ile kan akışının değişmesi sonucunda ortaya çıkan patolojik olaylar bütünüdür (7). İskemik beyin felci trombotik, embolik ya da sistemik bir hipoperfüzyon sonucunda gelişebilmektedir. Bu gibi durumlarda kontrollü dolaşımın bozulması beyne yeteri kadar kan gitmesine engel olmakta, dolayısı ile beyinde enerji ve oksijen eksikliğine sebep olmaktadır. Enerji ve oksijen eksikliği sonrasında patofizyolojik olaylar başlamaktadır (8).

4.2. İskemik Beyin Felci Patofizyolojisi

Düzenli kan akışının bozulmasıyla beyine yeterli oksijen ve glikoz taşınamamaktadır. Oksijen ve glikoz yokluğu enerji eksikliğine neden olmaktadır. Yetersiz pre-sinaptik nöronlarda voltaj bağımlı Ca^{+2} kapılarının açılmasına sebep olarak sinaptik aralığa glutamat salınmasına neden olur. Bu da post-sinaptik nöronda glutamat reseptörlerinin aktive olmasına sebep olmaktadır. Bu reseptörlerin aktive olmasıyla nöron hücrelerinde Ca^{+2} , Na^{+} , Cl^{-} iyonları birikirken, K^{+} iyonu ve glutamat hücreler arası ortama salınır. Post-sinaptik boşluğa salınan K^{+} iyonu ve glutamat diğer nöronlarda depolarizasyona yol açar ve bu depolarizasyonun yayılmasını sağlar. Hücre içinde biriken Na^{+} , Cl^{-} iyonları ise hücre dışındaki suyu hücre içine çeker ve ödem oluşur. İkincil mesajcı olarak bilinen Ca^{+2} iyonu ise birçok enzimatik yolağı aktive eder. Ca^{+2} iyonu aracılığı ile proteazlar, lipazlar ve endonükleazlar gibi birçok hücre içi enzim aktive olur. Bu enzimlerden bir kısmı direkt olarak serbest radikalleri ortaya çıkarırken diğer bir kısmı da mitokondri membranına zarar vererek serbest radikallerin oluşmasını sağlarlar. Oluşan serbest radikaller mitokondriye ya da DNA'ya hasar vererek apoptotik yolları aktive eder. Bunların yanı sıra serbest radikaller bir yandan da enflamasyonu başlatacak olan mikroglia aktivasyonunu ve lökosit infiltrasyonunu başlatır (9).

4.2.1. Glutamat birikimi ve ekzitotoksisite

İskemik koşullarda nöronlar oksijen ve glikoz olmadığından enerji üretimi için gerekli olan adenosin trifosfat (ATP) sentezini gerçekleştirememektedir. Yeterli ATP sentezi gerçekleşmediği zaman nöronal membran boyunca Na^+ - K^+ iyonları gradiyenti bozulur (10). Hücreler arası post-sinaptik boşlukta gereğinden fazla glutamat birikir. Bu birikim nöronlar için toksiktir. Endojen uyarıcı glutamat aynı zamanda N-metil-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) ve kainat tipi glutamat reseptörlerini aktive etmektedir. İyonotropik reseptörlerin aktive olması bu reseptörlerin ilgili iyon kanallarının açılmasını sağlamaktadır (11). Reseptör tipine göre iyon kanalları Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} iyonlarına geçirgenlik gösterir. NMDA kapılı iyon kanalları Ca^{+2} iyonuna geçirgenlik göstererek hücre içerisine Ca^{+2} iyonu girişine ve bu iyonların hücre içinde birikimine aracılık etmektedir (12).

4.2.2. Kalsiyum birikimi ve oksidatif stres

Kalsiyum, çok yönlü bir sinyal iyonu ve ikincil mesajcıdır. Hücre içi birçok yolakta iletişimin sağlanmasına aracılık etmektedir. Ca^{+2} iyonları hücre büyümesi, hücre farklılaşmasının kontrolü, egzozitoz, sinaptik aktivite, membran uyarımı gibi fonksiyonel ve hücre için önemli yaşamsal faaliyetlerin gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple nöronlarda sitozolik Ca^{+2} iyon konsantrasyonunu dengede tutmak çok önemlidir (13). İskemik beyin felcini takiben glutamat salınım mekanizmasının ve membran bütünlüğünün bozulmasıyla hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu artmaktadır. Birçok enzimatik reaksiyon için ikincil mesajcı olan Ca^{+2} iyonunun hücre içi miktarının artması, hücre içi enzimlerin aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır. Kalpainler hücrel fonksiyonları Ca^{+2} iyonu ile düzenlenen proteazlardır. Kalpainlerin aşırı aktivasyonu en başta sitoskeletal proteinler olmak üzere, mitokondriyal proteinlerin, membran proteinlerinin, taşıyıcı proteinlerin ve sinaptik veziküllerin kontrolsüz yıkımına neden olmaktadır. Endonükleazların aşırı aktivasyonu nükleik asitlerin parçalanmasına, lipazların aşırı aktivasyonu ise hücre içi ve membran lipidlerinin yıkımına sebep olur (14). Ortamda aşırı Ca^{+2} birikimi, kalsiyum bağlanma proteini kalmodulin üzerinden nitrik oksit (NO) sentezinde artışa neden olur. Nitrik oksit senteziyle reaktif oksijen türleri (ROT) sitozolde çoğalır. Sitozolde miktarı artan NO, fosfolipazları aktive eder. Fosfolipazlar yardımıyla

lipidler peroksidasyona uğrar ve yıkım ürünleri olarak serbest radikaller ortaya çıkar. Serbest radikallerden süperoksit anyonları (O_2^-) ile reaksiyona giren NO, peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur. Oluşan bu radikaller nörotoksik bir etkiye sahiptir (15, 16). Fizyolojik durumlarda hücrede, ROT ve serbest radikalleri temizleyebilecek antioksidan enzimler bulunmaktadır. Ancak iskemi sonrası artan Ca^{+2} konsantrasyonu sonucu ortaya çıkan ürünlerin normalden çok fazla olması, bu yıkım ürünlerinin hücre tarafından temizlenmesini engeller. Bu da serbest radikal üretimi ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasıyla oksidatif stresin oluşmasına yol açar. ROT ve serbest radikaller hem mitokondri DNA'sına hem de hücre DNA'sına zarar verir. Ek olarak, Ca^{+2} iyonları mitokondride de birikir, bu durum oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesini engeller. Artan oksidatif stres, mitokondriyal ve nükleer DNA'nın bozulması ve nörodejenerasyonun yanı sıra hücre ölüm yollarını da aktive etmektedir (16).

4.2.3. Endoplazmik retikulum stresi

Endoplazmik retikulum hücre içi birçok süreçte görev almaktadır. Salgı ve membran proteinlerinin sentezlendikten sonra katlanması ve sentezlenen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. Rol aldığı bir diğer önemli süreç ise hücre içi Ca^{+2} iyonu dengesini sağlamaktır (17). Kas kasılmasından sinaptik iletme birçok hücrel aktivitede önemli olan Ca^{+2} önemli bir ikincil mesajcıdır. Ca^{+2} 'un birbirinden farklı kompleks yollarda hiçbir karışıklığa sebebiyet vermeden sinyal iletimini sağlayabiliyor olması doğru konsantrasyonda, doğru zamanda, doğru aralıklarla salınıyor olması sayesinde. Endoplazmik retikulum hücre için önemli bir Ca^{+2} deposudur. Endoplazmik retikulum lümeninde katlanmayı bekleyen proteinlere şaperon proteinler bağlanır ve onların çökmesini veya yıkılmasını engeller. Endoplazmik retikulum lümeninde bulunan şaperon proteinleri kalsiyuma bağlı proteinlerdir (18). İskemi sonrası ortaya çıkan enerji eksikliğini takiben kalsiyumun endoplazmik retikuluma pompalanmasını sağlayan sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz enzimi işlevini yerine getiremez. Bunu takiben endoplazmik retikulumla ilişkili endoplazmik retikulum Ca^{+2} membran kanalları lümeninde depo edilen Ca^{+2} iyonlarını dışarı salar. Ca^{+2} yokluğunda şaperon proteinler görevlerini yerine getiremezler, proteinler degrade olur ya da hatalı katlanırlar (19). Hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinler proteozom tarafından

yıkılır, herhangi bir sebeple protein translasyonunun fizyolojik seviyenin üstünde olması hatalı proteinlerin artmasına neden olmaktadır. Bu durum iskemi sonrası değişen Ca^{+2} iyonu konsantrasyonu ile beraber hücre için stres yaratmaktadır. Ayrıca hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin artması, endoplazmik retikulumun görevini gereğince yerine getirememesine sebep olur, hatalı proteinler birikir ve bunun sonucunda katlanmamış protein yanıtı (UPR) oluşur. Hatalı proteinlerin birikmesiyle başlayan ve buna karşılık katlanmamış protein yanıtının oluşmasıyla devam eden sürece endoplazmik retikulum stresi denmektedir (20). ER stresin nekroz, otofaji ve apoptoz gibi ölüm yollarını aktive ettiği bilinmektedir (21).

4.2.4. Enflamasyon

İskemik beyin felci sonrasında gelişen enflamasyon en önemli patofizyolojik yanıtlardan bir tanesidir (22). Oluşan serbest radikaller enflamatuar yanıtın oluşmasına aracılık ederler. NO azalması vazokonstriksiyona sebep olur ve bir lökosit türü olan nötrofillerin hasarlı bölgeye infiltre olmasını kolaylaştırır. Mast hücreleri tarafından üretilen tümör nekrozis faktörü alfa (TNF- α) ve interlekin-1 beta (IL-1 β) gibi sitokinler lökositlerin infiltre olacağı yeri bulmalarını sağlar. Lökositler indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi pro-enflamatuar işaretçileri iskemik bölgeye bırakırlar. Hasarlı bölgedeki hücrelerden bir başka pro-enflamatuar işaretçi ATP sızıntısı olur. Bu sızıntı kemokinlerin ve sitokinlerin bölgeye gelmelerini sağlar. Bu süreçte hasarlı bölgede nöronların ve mikrogliaların iletişimleri de kopar. İletişim ancak hasarlı hücrelerden sızan ATP ile mikrogliaların aktive olmasıyla devam eder (23). Toll benzeri reseptörler (TLR) ve Nükleer faktör kappa B (NF κ B) immün sistemin aktive olmasını sağlayarak enflamatuar yanıt oluşturan iki önemli yolaktır. Enflamatuar yanıt oluşurken hasarın merkezi sinir sisteminde yayıldığı bilinmektedir (24).

4.2.5. Peri-infarkt depolarizasyonu ve yayılan depresyon

İskemi süresince kan akımının bozulmasıyla ortaya çıkan enerji eksikliğinde nöronlar ve glialar post-sinaptik boşluğa glutamat ve K^{+} salınımı yaparak depolarize olurlar. İskemiden etkilenen bölgenin merkezine çekirdek (*core*) bölgesi denmektedir. Beyindeki hasarlı dokunun merkezinde yer alan çekirdek bölgedeki nöronlar ve glialar

kontROLSÜZCE depolarize olurlar, sonrasında bir daha polarize olamazlar. Ancak kan akımı yetersiz olmasına rağmen çekirdek bölgenin etrafında yer alan penumbra bölgesinde nöronlar ve glialar daha fazla enerji harcayarak da olsa repolarize olabilirler. Sonrasında yine aynı hücreler ortamda fazlasıyla bulunan glutamat ve K^+ sebebiyle tekrar depolarize olur. Bu şekilde art arda tekrar eden depolarizasyonlara peri-infarkt depolarizasyon denmektedir. Çekirdek ve penumbra bölgeleri zamana bağlı değişim gösterebilir (9). Beynin enerji ihtiyacı diğer organlara kıyasla daha fazladır. Vücudun bazal metabolizma enerjisinin yaklaşık olarak beşte biri beyin tarafından kullanılmaktadır. Beyin için gerekli olan toplam enerjinin önemli bir kısmını ise Na^+/K^+ pompaları harcamaktadır. Yetersiz enerji bu pompaların gerektiği gibi çalışmasını engeller, Na^+ iyonlarının hücre içinde ve K^+ 'un hücre dışında birikmesine yol açarak ve iyon dengesinin bozulmasına yol açar. Bozulan iyon dengesine bağlı olarak depolarizasyon yayılır. Nöronların ve gliaların uzun süreli depolarize olması, sürekli depolarize olan nöronların membran direncinin bozulması, elektrokimyasal aktivite kaybı ve nöronlarda sitotoksik miktarda su birikimi yayılan depolarizasyona yol açar (25). Yayılan depolarizasyon ve buna ek olarak birçok metabolik olay sonucu nöronların ve bazı glial hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kitlesel olarak sonlanmasına yayılan depresyon denmektedir (26).

4.3. İskemik Beyin Felcini Tedavi Etmeye Yönelik Yaklaşımlar

İskemik beyin felcini tedaviye yönelik yaklaşımlar öncelikle tıkanan damarı açarak kanlanmayı sağlamayı hedeflemektedir. Araştırmacılar tarafından, ortaya çıkan patofizyolojik olayları hedef alan yaklaşımlar henüz çalışma aşamasındadır. Dokunun oksijenlenmesini sağlamak, oluşan glutamat toksisitesini gidermek ya da toksisite oluşmadan engellemek, iskemi sonrasında ortaya çıkan enflamatuar yanıtı baskılamak ve ölüm yollarının nöronal hücrelerde aktifleşmesini engellemek de hedefler arasındadır (27). Rekombinant doku plazminojen aktivatörünün (rtPA), iskemi sonra oluşan pıhtıyı çözmeye yönelik tedavi edici etkisi, ilk olarak 1995 yılında, Ulusal Nörolojik Hastalıklar ve İskemi (NINDS) çalışma grubu tarafından sunulmuştur (28). Amerikan Gıda ve İlaç Yönetim Merkezi (FDA) tarafından onaylı, klinikte kullanılan tek ilaç, trombolitik bir ajan olan rtPA'dır. Ancak bu ilaç hastalarda iskemi başlangıcından yalnızca 3 - 4,5 saat sonrasına kadar olumlu etki göstermektedir.

Belirtilen süre geçtikten sonra toksiktir (29). Bu sebeple hastaların sayıca yalnızca %2'si ila %5'ine uygulanabilmektedir (30). İskemik beyin felcini tedaviye yönelik çalışmalar arasında normobarik ve hiperbarik oksijen tedavileri de vardır. Bu tedaviler, dokuya uygulanan farklı basınç oranlarında oksijen ile dokuda oksijenlenmeyi sağlayarak kan akımını düzenlemeyi hedeflemektedir (31, 32). Hipoterminin nörodejeneratif hastalıklarda iyileştirici özelliği olduğu bilinmektedir. Vücut sıcaklığını 3 - 5 °C düşürmenin iskemi sonrasında meydana gelen patofizyolojik olayları iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür. Hipotermi hasar hacmini azaltmaktadır. Bunun yanı sıra anti-enflamatuar sitokinleri arttırırken, mikrogial aktivasyonu aza indirdiği de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (33).

4.4. Klinik Tedavi Çalışmalarının Başarısız Olma Nedenleri

Klinik tedaviye yönelik çalışmaların birçok başarısız olma sebebi vardır. İskemik beyin felci sonrası ortaya çıkan patofizyolojinin tedavi edilmesi zordur. Geliştirilen ilaçlar denendiği zaman ortaya çıkan sonuçların güvenilir olabilmesi için klinik öncesi araştırmalarda oluşturulan deney hayvanı modellerinin tekrar edilebilir olması gerekmektedir. Diğer bir nokta ise deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanların histolojik, morfolojik ve fizyolojik yapılarının insanla birebir aynı olmayışıdır (34). Hayvanlar üzerinde denenen ve iyileşmeye yardımcı olan birçok ajan, klinikte başarısız olmaktadır. Ayrıca insanlarda iskemik beyin felcine yakalanma yaşı genellikle 65 yaş ve üstüdür, araştırmalarda kullanılan hayvanlar ise çoğu zaman genç yetişkin hayvanlardır. Yaşlı ve genç hayvanların iskemik beyin felcine karşı geliştirdikleri yanıtın farklı olduğu bilinmektedir (35). Bu sebeple genç hayvanlarla yapılan deneylerde görülen iyileşme, klinikte görülememektedir (35). Tedavi stratejisi geliştirmekte zamanlamanın da büyük önemi vardır. Laboratuar şartlarında araştırmacılar, iskemik beyin felcine karşı geliştirilen ajanı beyin felci öncesinde, sırasında ya da sonrasında uygulayabilirler. Genellikle bu saatler araştırmacı tarafından belirlenmektedir. Fakat klinikte iskemik beyin felci geçiren bir insan hastaneye geldiğinde iskeminin tam olarak başlama saati bilinmemektedir. Geliştirilen ajanların ise etkin dozu ya da toksisitesi çoğu zaman tam anlamıyla deney hayvanlarından insana uyarlanamamaktadır (36).

4.5. Yaşlanma

Yaşlanma genellikle zamana bağlı artan yaş ile birlikte dokularda ve hücrelerde meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır. Yaşlanma birçok hastalık, hatta ölüm için önemli bir risk faktörüdür (37). Yaşlanma bir hastalık değil, fizyolojik bir süreçtir. Bu fizyolojik süreci anlamak ve açıklığa kavuşturmak için birçok teori üretilmiştir (38). Yaşlanma sürecini açıklamaya çalışan birçok teoriden kabul görmüş bazıları evrimsel teori, serbest radikal teorisi, mitokondriyal teori, gen ekspresyonu teorisi, telomer teorisi, enflamasyon hipotezi, immün teori ve nöro endokrin teorisidir (39). Evrimsel teoriye göre yaşlanma doğal seçilimin bir sonucudur (40). Serbest radikal teorisine göre hücrede biriken oksidatif stres yaşlanmaya sebep olur. Oksijenli solunum gibi çoğunlukla mitokondriyal metabolik reaksiyonlar sonrasında açığa çıkan yan ürünler olan reaktif oksijen türleri (ROT) oksidatif strese yol açan moleküllerdir. ROT'nin mitokondriyal ve nükleer DNA'ya hasar verdiği düşünülmektedir. Ayrıca ROT'nin yaşlanma ile arttığı, bazı türlerde ise reaktif oksijen türlerinin baskılanmasının yaşlanmayı durduğu bilinmektedir (41). Zamanla biriken mitokondriyal DNA mutasyonları, mitokondri tarafından yürütülen oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarına zarar vermektedir. Bu mutasyonlar sonucunda mitokondrinin metabolik yan ürün olarak ürettiği ROT'ların miktarı artar. Üretilen ROT'lar yine mitokondriyal DNA'ya zarar verir ve bu bir döngü olarak yaşlanma sürecini hızlandırır (39). Gen ekspresyonu teorisine göre yaşlanma gen ekspresyonunun değişime uğraması sonucunda hücrelerin yaşlanmasıyla ilgilidir. Yaşlanma süresince gen ekspresyon profilinde değişimler olduğu bilinmektedir (42). Kromozom uçlarında bulunan heterokromatin yapıları telomerler her hücre bölünmesi sonrasında kısalırlar. Telomer uzunluğu belli bir seviyeye ulaştığı zaman hücre bölünmesi durur. Telomeraz enzimi telomer sentezinden sorumludur. Canlılığın devamı konusunda önemli olan gonadal hücrelerde telomeraz aktivitesi somatik hücrelere göre daha fazladır. Ancak yine de telomeraz telomerlerin kısalmasını tamamen engelleyemez. Telomer teorisine göre yaşlanma sürecini etkileyen en büyük faktör kısalan telomerlerdir (43). Enflamasyon hipotezine ve immün teoriye göre yaşlanma süreci, patolojik durumlarda hücresel ve moleküler mekanizmaların geliştirdiği immün yanıtlarla kontrol edilmektedir (44). Nöroendokrin teoriye göre ise yaşlanmaya, sinir istemi nöronlarının komutları ve buna karşı hipotalamus-hipofiz-

adrenal aksının oluşturduğu yanıtlar arasındaki fonksiyonel bozulmalar sebep olmaktadır (42). Yaşlanma birçok moleküler ve metabolik olayın içinde bulunduğu kompleks bir süreçtir. Bu sürecin anlaşılabilmesi için zamanla oluşturulan teoriler tek başına düşünülemez ve her biri aslında alt basamaklarında iç içe geçmiş bir ağ gibi birbirini etkilemektedir (45).

4.5.1 Yaşlanma ile ilgili hücresel ve moleküler mekanizmalar

Hücre içi ya da hücre dışı kaynaklı stres, hücre için moleküler düzeyde bir hasar oluşturmaktadır. Oluşan hasar hücre tarafından her zaman efektif bir şekilde onarılamaz. Böylece hasar birikir. Çoğu zaman biriken hasar hücreler arası hatalı sinyal iletimine ve enflamasyona neden olmaktadır. Hücre düzeyindeki hasarları akabinde doku seviyesinde fonksiyonel bozulmalar takip eder. Bu süreçte stresle karşılaşılan andan itibaren antioksidan onarım mekanizmaları hücresel hasarın baskılanması yönünde çalışır. Ortadan kaldırılan hasar bu mekanizmaların çalışma şekilleri sebebiyle hücre için yeni bir stres yanıtı oluşturmaktadır. Oluşan stres yanıtı enflamasyon, DNA metillenmesi ve hatta kök hücre kaynaklarının kullanılmasıyla rejenerasyonu tetikler. Ancak hücrede stresle meydana gelen rastgele moleküler hasarın birikim miktarı, hasarı onarmakla yükümlü antioksidanların kapasitesine ve onarım mekanizmalarının çalışma verimine bağlıdır. Onarım sistemleri enerji bağımlı çalışmaktadır ve buna bağlı olarak her zaman hasarı tamamıyla ortadan kaldıramamaktadır. Onarım sonrasında bir miktar hasar onarılmadan kalmaya devam eder. Aynı şekilde bir süre sonra onarım mekanizmaları da biriken hasarın etkisiyle yavaşlar, dokusal fonksiyonlarda bozulmalar ortaya çıkar ve yaşlanma meydana gelir (46). Yaşlanmayı indükleyen ya da yaşlanma sürecine dahil olan birçok mekanizma vardır. Hücre genomunu hedef alan nokta mutasyonları, kromozomal delesyonlar, duplikasyonlar ve translokasyonlar, telomerlerin kısalması veya virütik entegrasyonlar genomik kararsızlığa neden olmaktadır. Hem mitokondriyal DNA hem de nükleer DNA için genomik kararsızlık bir tehdittir (47). Zamanla DNA’da biriken hasar genom kararsızlığına sebep olduğu kadar bazı kromozomal bölgelerde bozulmalara da yol açmaktadır. Kromozom uçlarında bulunan telomerler yaşlanmayla beraber biriken hasara duyarlıdır (48). Epigenetik düzenlemeler de yaşlanma sürecinde hücreyi etkileyen faktörlerdendir. Bu düzenlemeler DNA metilasyonlarını, histon

modifikasyonlarını, kromatin yapısındaki değişimleri içermektedir (49). Protein homeostazisi, proteostaz yaşlanma nedeni ile değişen bir başka moleküler sistemdir. Bu sistem, proteomun işlevsel olabilmesi için birçok yolağın bir arada çalışmasıyla protein dengesini sağlamaktadır. Normal koşullarda bu sistem koordine bir şekilde çalışır ve dengeyi bozan herhangi bir sorunu düzeltir. Ancak yaşlanma ile birlikte protein homeostazisi bozulmaya başlamaktadır. Bu sisteme dahil olan şaperonlar yeni sentezlenmiş proteinlerin çökelti oluşturmada, istenmeyen katlanmaları engelleyerek proteinlerin düzgün katlanmalarından sorumludur. Yaşlanmanın etkisiyle şaperonlarda azalma görülür. Bunu takiben hatalı katlanan proteinlerin miktarı artar. Artan hatalı proteinler hücrede çökelti oluşturur. Yine yaşlanmanın etkisiyle hatalı proteinlerin eliminasyonunu sağlayan şaperon aracılı otofaji ve ubiquitin-proteazom aktivitesi azalır. Böylece hücresel protein dengesi bozulur; bu da dokuda fonksiyon kaybına yol açar. Zamana bağlı fonksiyon kaybı yaşlanmayla ilişkilendirilir (50). Yaşlanmanın moleküler göstergelerini 2013 yılında Otin ve arkadaşları genomik instabilite, telomer yıpranması, epigenetik değişimler, proteostaz dengesinin bozulması, mitokondri fonksiyonunda bozulma, kök hücre kaynaklarının tükenmesi gibi başlıklar altında toplayıp bir derleme ile mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamıştır (51). Yaşlanma tek bir mekanizmanın incelenerek anlaşılamayacağı kompleks bir süreçtir. Her bir mekanizma incelendiğinde diğer mekanizmalarla etkileşim içinde olduğu görülmektedir (52).

4.5.2. Yaşlanma sürecinde beyin

Beyin yaşlanma sürecinden en fazla etkilenen organlardan bir tanesidir. Fazla enerji harcaması sebebiyle ihtiyacı olan oksijen miktarı ve oksijenin mitokondri tarafından kullanıldığı yolların metabolik atıklarının diğer organlara kıyasla fazla olması, bu metabolik atıkların hasar verdiği genomik ve hücresel yapılara karşı koruyucu görevi gören ve gerektiğinde dışarıdan alınan antioksidanlar için ulaşamaz olması beynin bu süreçten etkilenmesinin başlıca nedenidir. Kendini yenileyebilme özelliğinin sınırlı olması da yaşlanmanın etkilerini beyinde fark ettirir (53). Beyinde meydana gelen hücresel, morfolojik ve fonksiyonel değişimlere özellikle nöron ve glia hücrelerinde yaşlanmaya bağlı olarak gerçekleşen moleküler değişimler neden olmaktadır. Bu süreçte bozulan protein homeostazisi nedeniyle nöronların içinde ve

etrafında nöronal plaklar oluşur, oluşan plaklar ölüm yollarını indükler ve nöron kaybı olur. Mikrogliaların aşırı aktif bir şekilde çalışması kronik enflamasyonu artırır. Nöronal büyüme faktörlerinin salınımı azalır ve nörogenez neredeyse durur. Oligodendrogliozis ve astrogliozis gözlenir. Oligodendrositlerin artması miyelinizasyonu artırır (54). Ortamda bulunan plaklar, nöronal düğümler, sayısı normale göre çokça artan oligodendrositler ve astrositler nörotransmitterler aracılığıyla yapılan nöronal iletimi yavaşlatır. Bozulan nöronal fonksiyonların sonucunda sinaps sayısında ve sinaptik plastisitede azalma görülür (55, 56). Yapılan araştırmalarda, nörolojik bir hastalık geçmişine sahip olmaksızın, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tekniği kullanılarak yaşlanma ile birlikte ventriküllerde, serebral kortikal sulkuslarda genişleme görüldüğü bildirilmiştir (57). Süreçle ilgili olduğu düşünülen diğer iki bölge de gri (*grey matter*) ve beyaz maddedir (*white matter*). Yaşlanma sürecinde beyinde hem gri maddede hem de beyaz maddede hacimsel değişiklikler olduğu bilinmektedir. Gri madde hacmi orta yaşlı gruplarda azalmaya başlayıp yaşlanmayla bu azalmanın artarak devam ettiği dikkat çekerken, beyaz maddede meydana gelen hacimsel azalmanın yaşlı gruplarda daha belirgin olduğu gösterilmiştir (58). Beyin dokusunda oksijenlenme diğer bütün dokular gibi vasküler sistem tarafından sağlanır. Vasküler sistem için geçirgenlik; besin, oksijen gibi dokunun ihtiyacı olan maddelerin dokuya taşınması, çeşitli metabolik atıkların dokudan uzaklaştırılması için önemlidir. Ancak geçirgenliğin artması, yani hiper geçirgenlik (*hiperpermeability*), taşınan maddenin dokular arası boşuklara sızmasına neden olmaktadır. Bu sızıntı (ya da ödem), iskemi gibi patojik sonuçlara neden olabilir. Damarların içinde bulunan vasküler endotel hücreleri yaptıkları hücresel bağlantılarla geçirgenliği dinamik bir şekilde kontrol etmektedir. Ayrıca vasküler endotel hücreler, anjiyogenezi ve vasküler homeostazisi kontrol etmektedir. Vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon gibi mekanizmaları kullanarak kan basıncının dengede tutulmasını sağlamaktadırlar. Yaşlanma sürecinde artan ROT miktarı, bu hücreleri de olumsuz etkilemektedir. Artan oksidatif strese yanıt olarak apoptotik ölüm yolları aktifleşir. Bunun sonunca hem hücresel hem de fonksiyonel kayıplar olur, endotel hücreler arasındaki bağlar bozulur ve geçirgenlik artar. Bu süreçten beyni koruyan en güçlü yapı olan, yapısında endotel hücreleri bulunduran kan beyin bariyeri de etkilenir. Kan

beyin bariyerinde hiper geçirgenlik meydana gelir. Bu da istenmeyen maddelerin beyne sızması demektir, birçok patolojik sonucu doğurabilir (59).

4.5.3. Yaşlanmaya bağlı sık görülen hastalıklar

Yaşlanma birçok yaygın hastalık için risk faktörüdür. Bu hastalıklar arasında, sıralamada nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar önde gelmektedir. Gelişmiş ülkelerde; demans, Alzheimer hastalığı ve iskemik beyin felci yakalanma sıklığı belli bir yaştan sonra oldukça artan hastalıklardır. Sağlıklı bir yaşam için gerekli olan sistemlerde yaşlanmayla beraber mutasyonların, hücresel ve moleküler mekanizmaların yan etkilerinin birikmesi sonucunda bu hastalıklar ortaya çıkmaktadır (60).

4.6. İskemik Beyin Felcine Karşı Geliştirilen Yanıtlar

Beyin felci her ne kadar 65 yaş ve üzeri bireylerde daha sık görülse de beyin felci hastalarının %10'luk bir kısmını 50 yaş ve altındaki bireyler oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda beyin felci geçirmiş yaşlı hastaların ölüm oranının genç hastalara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (61). Bunun yanı sıra yaşlı ve genç hastalarda hastalığın seyri hakkında bilgi veren farklı çalışmalar vardır. Bazı çalışmalar beyin felci geçiren yaşlı hastaların bu hastalığı daha ağır geçirdiğini (62-64), hastalık sonrası iyileşmenin yaşlı hastalarda daha zor olduğunu ortaya koyarken, bazı çalışmalar ise bu hastalığın görülme sıklığının yaşlanma ile artması yüzünden literatürde gençlerle ilgili çalışmaların ihmal edildiğini söylemektedir (65).

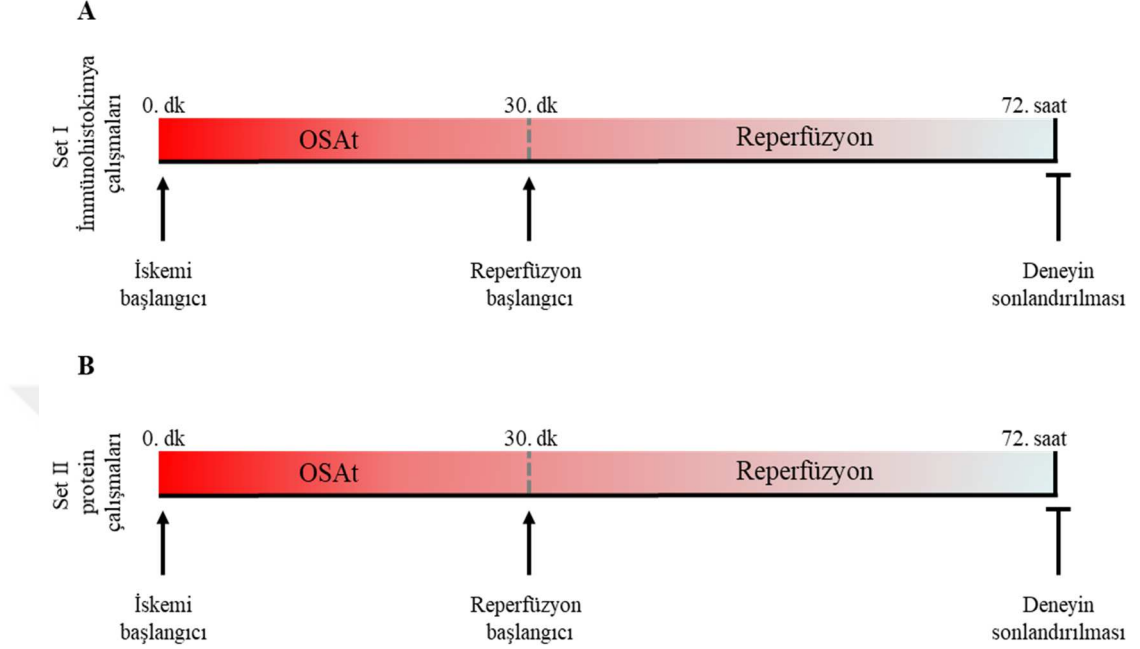
Literatürde iskemik beyin felci sonrasında yaşlı hayvanlarda (18-20 ay, Sprague Dawley (SD) sıçan) hasar gelişiminin genç hayvanlara (3-4 ay, SD sıçan) kıyasla daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, yine aynı çalışmada yaşlı hayvanlarda apoptotik hücrelerin daha fazla bulunduğu belirtilmiştir. İyileşme ise genç hayvanlarda daha hızlıdır (66). Başka bir çalışmada ise yaşlı (13-14 ay, C57BL/10J fare) ve genç (2-3 ay, C57BL/10J fare) hayvanlar karşılaştırıldığında, yaşlanmaya bağlı olarak mikrogliyal proliferasyonun arttığı, hücre göçünün yavaşladığı ve nöroenezde azalma olduğu gösterilmiştir (67). Bir diğer çalışmada yaşlı hayvanlarda (18-20 ay, SD sıçan), genç hayvanlara (3-4 ay, SD sıçan) göre glial aktivite artmıştır. Artan glial aktivite hasar alanının çevresinde glial yara oluşumuna sebep vermiş ve bu

oluşumun fonksiyonel iyileşmeyi azalttığı belirtilmiştir (68). Serebral kanlanmada ise yaşlı (18 ay, C57BL/10J) ve genç (9-12 hafta, C57BL/6) farelerde iskemi sonrası aynı oranda düşüş olduğu belirtilmiştir (69). Anjiyogenezin, hem yaşlı hayvanda (24 ay, Fisher sıçan) hem de genç hayvanda (3 ay, Fisher sıçan) iskemi ile indüklendiği gösterilmiştir (70). Ancak bazı çalışmalarda iskemi sonrası tetiklenen nörogenezin yaşlı (3-15 ay, Wistar sıçan) ve genç (5 hafta, Wistar sıçan) hayvanlar arasında değişiklik göstermediği (71); bazı çalışmalarda ise yaşlı hayvanlarda (10 ay, SD sıçan) nörogenezin arttığı gösterilmiştir (72).

Sonuç olarak; iskemik beyin felci görülme sıklığı 65 yaş ve üzerinde diğer yaş gruplarına göre oldukça artmaktadır (73). İskemik beyin felci görülme sıklığı yaşla birlikte artsa da araştırmalarda kullanılan deney hayvanları grupları genellikle genç hayvanlar olmaktadır. Ancak, yaşlı ve genç hayvanların iskemiye karşı geliştirdikleri yanıt ve hasarı onarabilme kapasiteleri birbirinden farklıdır. Ayrıca, araştırma yapılan hayvanın yaşlı olarak tanımlanabilmesi için belli bir standart bulunmamaktadır. Yapılan araştırmaların kliniğe uyarlanabilirliğini azaltan sebeplerden bir tanesi de araştırmacıların farklı yaş aralıklarında deney hayvanlarıyla çalışarak gruplar arasındaki varyasyonu arttırmasıdır. Bu sebeple, iskemik beyin felcini *in-vivo* ortamda yaşlı deney grupları ile çalışıp, yaşlı beyin fizyolojisinin geliştirdiği yanıtın mekanizmasını çözmeye çalışmanın önemli olduğu düşünülmektedir.

5. MATERİYAL VE METOT

5.1. Deney Dizaynı ve Gruplar



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı. A) Set I hayvanlarından immünohistokimya çalışmaları yapılmıştır. B) Set II hayvanlarından protein çalışmaları yapılmıştır.

Tüm deneysel prosedürler, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı ile ilgili yerel talimatlara göre İstanbul Medipol Üniversitesi'nden alınan yerel etik kurul onayı (2017-33) ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık periyotta olacak şekilde düzenli aydınlatma koşulları altında yetiştirilmiştir. Ayrıca deney hayvanları su ve yeme *ad libitum* olarak erişebilmektedir. Deney gruplarında rastgele seçilen 20-25 gram ağırlığında, 8-12 haftalık genç yetişkin (n=14) ve 18-24 aylık yaşlı (n=14) C57BL/6j erkek fareler kullanılmıştır. Her bir fare için beyin felci modeli 30 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAt) ve sonrasında 72 saat reperfüzyon ile oluşturulmuştur (74, 75). 72 saat sonrasında deney hayvanları sakrifiye edilmiş, beyinler izole edilerek kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Dondurulan beyinlerden immünohistokimya ve protein çalışmaları için örnekler hazırlanmıştır. Örnekler kullanıma kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Tablo 5.1.1. Kullanılan deney grupları. Set I hayvanlarından immünohistokimya, Set II hayvanlarından ise protein çalışmaları için örnek toplanmıştır.

Grup Adı	Hayvan Adedi
Set I-Genç hayvan, 30 dk beyin felci, 72 saat reperfüzyon	7
Set I-Yaşlı hayvan, 30 dk beyin felci, 72 saat reperfüzyon	7
Set II-Genç hayvan, 30 dk beyin felci, 72 saat reperfüzyon	7
Set II-Yaşlı hayvan, 30 dk beyin felci, 72 saat reperfüzyon	7
Toplam Hayvan Sayısı	28

5.2. Orta Serebral Arter Oklüzyonu ve Reperfüzyon

20-25 gram ağırlığındaki erkek C57BL/6 fareler % 1,5 izofluran (% 30 O₂, geri kalanı N₂O) ile anesteziye alınmıştır. Anesteziye alınan hayvanların vücut ısıları rektal prob yardımıyla ölçülmüş, homeotermik ısıtma sistemiyle 36,5-37 °C arasında tutulmuştur (Harvard instruments, ABD). Deney süresince kan akımı, esnek 0,5 mm fiber optik Laser Doppler (LDF) probunun (Perimed, Stockholm, İsveç) orta serebral arter üzerindeki kafatası bölgesine (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) temas edecek şekilde sabitlenmesiyle ölçülmüştür. Orta serebral arter tıkanması (OSAt) ile oluşturulan fokal serebral iskemi, intralüminal filament tekniği kullanılarak indüklenmiştir (74, 75). Bu teknik ile sırasıyla, boynun orta hattında insizyon yapılmış, sol common karotid arter ve eksternal karotid arter izole edilmiş, izolasyon sonrasında arterler 7.0 ipek ip (Doğsan, Türkiye) ile bağlanmıştır. Sol internal karotid arter üzerine ise bir adet mikrovasküler klips yerleştirilmiştir (FE691: Aesculap, Tuttlingen, Almanya). Klips yerleştirildikten sonra orta serebral arter tıkanması için sol common karotid artere küçük bir insizyon yapılmış ve buradan içeriye önceden silikon (Xantopren: Bayer Dental, Osaka, Japonya) ile kaplanarak çapı 180-190 µm'ye çıkarılmış 8.0 naylon monofilament (Ethilon; Ethicon, Norderstedt, Almanya) itilmiştir. İtilen naylon monofilament internal karotid arter içerisinde, karotid bifürkasyonundan 9 mm distal yönde direnç hissedilinceye kadar ilerletilmiştir. Bu yöntemle 30 dakika boyunca orta serebral artere kan akışı engellenmiştir. Otuz dakika sonra silikon kaplı naylon filament geri çekilmiş ve reperfüzyon başlatılmıştır.

Reperfüzyon başlangıcından itibaren 20 dakika boyunca LDF ile kayıt alınmaya devam edilmiştir. Boyunda oluşturulan insizyon 5.0 ipek ip ile sütür atılarak kapatılmıştır. Sonrasında anestezisi sonlandırılan fareler ilgili kafeslerine yerleştirilmiştir.

5.3. Beyin Kesitlerinin Alınması ve Örnek Toplama

Otuz dakikalık orta serebral arter oklüzyonunu takiben 72 saatlik reperfüzyona alınan hayvanlar, reperfüzyon bitiminde yüksek doz izofluran ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların beyinleri ivedilikle izole edilip kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Dondurulan beyinler örnek toplama işlemine kadar -80 °C’de saklanmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmalar ve immünofloresan çalışmalar için beyinler kryostat (CM1950, Leica, Almanya) kullanılarak kesilmiştir. Doku dondurma medyumuna (14020108926, Leica, Almanya) ile serebellumlarından kryostat cihazına sabitlenen beyinlerden bregma 0’dan itibaren 2 mm rostral-2 mm kaudal aralığında, 18 µm kalınlığında koronal kesitler alınmıştır. Pozitif yüklü camlara (Objekttrager; Isotherm, Almanya) alınan kesitler, 40 °C sıcaklıkta bulunan ısıtıcı tabla (WiseTherm HP-LP, Wisd Laboratory Equipments, Almanya) üzerinde 30 dakika boyunca sabitlenmeye bırakılmıştır. Sabitlenen kesitler immünohistokimya ve immünofloresan çalışmalar yapılncaya kadar -80 °C’de saklanmıştır. Protein çalışmaları için ipsilateral hemisferlerin striatum bölgelerinden doku alınmıştır. Dokular, ilgili çalışmada kullanıncaya kadar 2 ml’lik mikrosantrifüj tüpler içerisinde, -80 °C’de muhafaza edilmiştir (74, 75).

5.4. Cresyl Violet Boyaması ile Hasar Analizi

Cresyl violet boyaması 30 dakika OSA sonrası 72 saat reperfüzyon ile beyin felci oluşturulan farelerin izole edilen beyinlerinden kryostat cihazı ile 18 µm kalınlığında Bregma 0 mm seviyesinden alınan koronal kesitlere yapılmıştır. -80 °C’de saklanan beyin kesitleri oda sıcaklığına çıkarılarak 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kesitler şale yatağına dizilerek %4’lük paraformaldehit (PFA, 158127; Sigma, ABD) içerisine koyulmuş ve 7 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kesitlerin bulunduğu şale yatağı %4’lük PFA’dan çıkarılarak sırasıyla dH₂O ve fosfat tamponlu salin çözeltisine (PBS, 0.1 M, pH 7,4)

batırılıp çıkarılmıştır. Temiz PBS'ye alınan kesitler 3 kere 5'er dakika boyunca çalkalayıcı (Unimax 1010; Heidolph, Almanya) üzerinde yıkanmıştır. Yıkamaların sonrasında tekrar içerisinde dH₂O bulunan şaleye batırılıp çıkartılan örnekler, içerisinde *cresyl violet* (C5042-106, Sigma, ABD) olan şaleye alınmış ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda içerisinde *cresyl violet* ve kesitler bulunan şale çalkalayıcı üzerine konulmuş, 13 dakika daha oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra içerisinde dH₂O bulunan 3 ayrı şaleye daldırılıp çıkarılan kesitler 20'şer saniye süreyle sırasıyla %70, %90, %95 ve %100 etanol (24102, Sigma, ABD) serisinden geçirilmiştir. Kesitler bir peçete üzerinde süzdürülüp şale yatakları ile birlikte içerisinde ksilen (108684, Merck, ABD) bulunan başka bir şaleye alınmış ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak beyin kesitlerinin üzerine kapatma ortamı olarak entellan (1.079.610.500, Merck Millipore, ABD) damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Tarayıcı yardımıyla kesitler taratılmıştır. Kontralateral ve ipsilateral striatum ImageJ programı (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) kullanılarak ölçülmüş, böylece hasar analizi yapılmıştır (75).

5.5. TUNEL Boyaması ile DNA Fragmentasyon Analizi

DNA fragmentasyonu boyaması (TUNEL), *in situ* hücre ölümü deteksiyon kiti (*In Situ Cell Death Detection Kit*, 11684795910, Roche, İsviçre) kullanılarak 30 dakika OSA tıkanması sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin beyinlerinden kryostat cihazı ile 18 µm kalınlığında alınan 2. seviye kesitlerine yapılmıştır. Kesitler öncelikle %4 PFA ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında PBS ile yıkanan kesitlerde antijen geri kazanımı sitrat tamponu (pH 6,0) ile yapılmıştır. Normal keçi serumu (NGS, G9023, Sigma, ABD) ile bloklanan kesitler TUNEL reaksiyon karışımı ile inkübe edilmiştir. Son olarak DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole, D9542, Sigma, ABD) çekirdek boyası ile boyanan kesitlere floresan sinyalin solmasını engelleyici kapatma ortamı Fluoromount (F4680, Sigma, ABD) eklenmiş daha sonra kesitlerin üzeri lamelle kapatılmıştır. Kapatma ortamı kuruduktan sonra, kesitler taramalı konfokal laser mikroskopu kullanılarak (LSM 780, Zeiss, Almanya) görüntülenmiştir. Boyanan kesitlerin ipsilateral striatum bölgesindeki TUNEL pozitif hücreler, yani DNA'sı fragmente olmuş hücreler rastgele (*region of interest: ROI*) 12 bölgede

sayılmıştır. İpsilateral striatum için sayılan bölgelerin ortalama değeri hesaplanmıştır (74, 75).

5.6. İskemik Striatumda NeuN Boyaması ve Nöronal Sağkalım Analizi

NeuN (MAB377X, MerckMillipore, Almanya), antikoru kullanılarak immünohistokimya boyamaları yapılmıştır. Bu boyamalar, 30 dakika OSA tıkanması sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin izole edilen beyinlerinden kryostat cihazı ile 18 µm kalınlığında alınan 2. seviye kesitlerine yapılmıştır. Eksi 80 °C’de saklanan beyin kesitleri oda sıcaklığına çıkarılarak 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kesitler şale yatağına dizilerek %4’lük PFA içerisine koyulmuş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında kesitlerin bulunduğu şale yatağı %4’lük PFA’dan çıkarılarak dH₂O bulunan şaleye 1 kez batırılıp çıkartılmıştır. Şale yatağı değiştirilen kesitler 3 kere 5’er dakika boyunca PBS ile çalkalayıcı (Unimax 1010; Heidolph, Almanya) üzerinde yıkanmıştır. PBS ile yıkanan kesitlerde antijen geri kazanımı sitrat tamponu (pH 6,0) ile yapılmıştır. %0,3 Triton-X (X100, Sigma, ABD) bulunduran PBS çözeltisine %10 NGS eklenerek elde edilen bloklama çözeltisi ile kesitler oda sıcaklığında, 1 saat boyunca çalkalayıcı (Unimax 1010; Heidolph, Almanya) üzerinde bloklanmıştır. Bloklama işlemi sonrasında, %0,3 Triton-X bulunduran PBS içerisinde %2 NGS ile 1:100 oranında seyreltilmiş Alexa Fluor 488 konjuge anti-NeuN primer antikoru kesitlerin üzerine eklenmiştir ve +4 °C’de, gece boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün (14-16 saat sonra), kesitler 3 kere 5’er dakika boyunca PBS ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Son olarak kesitler DAPI çekirdek boyası ile boyanmış ve kesitlerin üzerine Fluoromount kapatma ortamı damlatılarak kesitler lamellerle kapatılmıştır. Değerlendirme yapabilmek için, kesitler taramalı konfokal laser mikroskopu kullanılarak (LSM 780, Zeiss, Almanya) görüntülenmiştir. Boyanan kesitlerin ipsilateral striatum bölgesinde, NeuN immünopozitif hücreler rastgele (*region of interest: ROI*) 12 bölgede sayılmıştır. İpsilateral striatum için sayılan bölgelerin ortalama değeri hesaplanmıştır (74, 75).

5.7. IgG Boyaması ve Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliği

Vectastain kit (PK-7800, Vector Laboratories, ABD), kullanılarak IgG boyaması yapılmıştır. 30 dakika OSA tıkanması sonrasında 72 saat reperfüzyon ile iskemik beyin felci indüklenen farelerin izole edilen beyinlerinden kryostat cihazı ile 18 µm kalınlığında alınan bregma seviyesindeki kesitlerine yapılmıştır. Eksi 80 °C’de saklanan beyin kesitleri oda sıcaklığında 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kesitler %4’lük PFA ile 15 dakika oda sıcaklığında fiksasyona bırakılmıştır. Fiksasyon sonrasında kesitler dH₂O’dan geçirilmiş ve 5 dakika boyunca PBS ile çalkalayıcı (Unimax 1010; Heidolph, Almanya) üzerinde yıkanmıştır, PBS yıkaması 3 kez tekrar edilmiştir. Yıkama sonrasında 0.3% H₂O₂ içeren metanol solüsyonu içinde örnekler 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. On dakika boyunca kit içerisindeki serumla bloklanan örnekler sonrasında biotinlenmiş sekonder antikor ile muamele edilmiştir. Sonrasında streptavidin/peroksidaz kompleksi ile inkübe edilen örnekler DAB substratı (SK-4100, Vector Laboratories, ABD), damlatılmış ve renk değişimi gözlenmiştir. Boyanan kesitler tarayıcı ile taranmış, iskemik striatum ve korteksteki IgG geçişi densitometrik olarak ImageJ programı kullanılarak hesaplanmıştır (76).

5.8. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi için Örnek Hazırlama

30 dakika OSAt sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin beyinlerinden proteomiks çalışması yapılmıştır. Protein çalışmaları için beyinlerin ipsilateral hemisferlerin striatum bölgelerinden alınan dokular kullanılmıştır. İki ml’lik mikrosantrifüj tüpler içerisinde, -80 °C’de muhafaza edilen dokular tartılmıştır. Çalışmaya buz üzerinde devam edilmiştir (74).

5.8.1. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu için UPX (Universal Protein Extraction Kit, 44101, Expedeon, Almanya) kullanılmıştır. Kullanmaya başlamadan önce UPX içerisine %1 olacak şekilde proteaz-fosfataz inhibitör karışımı (5872, Cell Signaling, ABD) eklenerek ekstraksiyon karışımı elde edilmiştir. Bir gram doku üzerine 500 µl ekstraksiyon karışımı eklenmiştir. Her bir tüpe 4 adet zirkonyum bilye (D1132,

Benchmark Scientific, ABD) eklenmiştir. İçerisinde örnek bulunan mikrosantrifüj tüpleri BeadBug Microtube Homogenizer (Z763713, Sigma, ABD) cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler 10 saniye boyunca homojenize edilmiş, homojenizasyon bitiminde örnekler buza konmuştur. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Homojenizasyon sonrası örnekler 95 °C’de 5 dakika boyunca su banyosunda (Nüve, Türkiye) inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon bitiminde örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına ulaşan örnekler 1 saat boyunca +4 °C’de bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 10 dakika boyunca 15.000 g’de santrifüj edilmiş ve oluşan üst faz temiz mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Kullanılincaya kadar protein örnekleri -80 °C’de saklanmıştır (74).

5.8.2. Protein konsantrasyonu ölçümü

Örneklerden izole edilen proteinlerin konsantrasyonları Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen, Life Technologies Corporation, ABD) kullanılarak, Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies Corporation, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. Örnek sayısı ve kalibrasyon için gerekli olan 3 standart göz önünde bulundurularak tampon solüsyonu hesaplanmıştır. Qubit için özel olan tüplere her bir standart için 190 µl, örnekler için ise 198 µl tampon solüsyonu konulmuştur. Standartlar 10 µl, örnekler ise 2 µl olacak şekilde ilgili tüplere eklenmiştir. Tüpler hassas vorteks (Heidolph, Almanya) ve mikrosantrifüj ile kısa süreli santrifüj yapıldıktan sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitince konsantrasyonlar, Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies Corporation, USA) cihazı ile ölçülmüştür .

5.8.3. Filtre destekli örnek hazırlama (FASP) ile triptik peptidlerin eldesi

Triptik peptidler, filtre destekli örnek hazırlama protokolüne (Filter Aided Sample Preparation Protocol, 44250, FASP) göre hazırlanmıştır (77). Yüz µg örnek son hacmi 230 µl olacak şekilde üre solüsyonu (6 M) ile tamamlanmıştır. 230 µl örnek ve üre karışımı FASP kiti filtreli tüplerine eklenerek 15 dakika boyunca 14.000 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası filtreli tüpün üzerine 200 µl daha üre solüsyonu eklenerek santrifüj tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrasında dipte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve filtre üzerine üre ile seyreltilmiş 100 µl iyodoasetamit (10 mM)

solüsyonu eklenmiştir. Kısaca vortekslenen örnekler 40 dakikayı aşmayacak şekilde karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler 10 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler üçer kez ayrı ayrı üre (6 M) ve amonyum bikarbonat (50 mM) ile yıkanmıştır. Örneklerin bulunduğu filtreye 75 µl tripsin solüsyonu (90057, Pierce, ABD) eklenerek, kısa bir vorteks yapılmıştır ardından tüp parafilmelenmiş ve 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün yeni tüpe alınan filtre 2 kere 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkanmıştır. Yıkamaların bitiminde filtre üzerine 50 µl, 0,5 mM sodyum klorür solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüj edilerek triptik peptidler filtreden ayrıştırılmıştır. Triptik peptidlerin konsantrasyonu kit (Quantitative Colormetric Peptide Assay, 23275, Pierce, ABD) yardımıyla ölçülmüştür. Triptik peptidler, LC-MS/MS sistemine yüklenmeden önce 100 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde tüplere ayrılmış, liyofilize edilmiştir. Kullanmadan hemen önce %0,1 formik asit (FA, Sigma-Fluka, ABD) içerisinde çözülmüştür.

5.8.4. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi ve veri işleme

Sıvı Kromatografisi ve Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) analizi ve izleyen protein tanımlamaları daha önce yayınlanan bir protokole göre yapılmıştır (78, 79). Bu analiz için ACQUITY UPLC M sınıfı kolonların bağlı olduğu, yüksek çözünürlüklü SYNAPT G2-Si (Waters, ABD) kütle spektrometresi kullanılmıştır. Kolonlar, %97 mobil faz A (%0,1 FA içeren UHPLC dereceli suda, Merck, ABD) ile dengelenmiş ve sıcaklık 55 °C olarak ayarlanmıştır. Triptik peptidler kolonlara yüklenmiş ve 90 dakika gradyentli ayrıştırma ile yakalama (*trap*) kolonundan (Symmetry C18, 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm, Waters), analitik kolona (CSH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm, Waters) ayrıştırılmıştır. Bu ayrıştırma %0,1 FA (h/h) içeren, gradyenti %4'ten %40'a olan asetonitril (ACN) ile 0,400 µl/dk akış hızıyla yapılmıştır. MS ve MS/MS taramalarının pozitif iyon modları 0,7 saniye döngü süresi ile sırayla gerçekleştirilmiştir. Düşük çarpışma enerjisi 10 volt, yüksek çarpışma enerjisi ise 30 volt olarak ayarlanmıştır. İyonlar, iyon hareketlilik ayrımı (IMS) ile ayrılmıştır. Bir IMS döngüsü boyunca bir dalga hızı 1000'den 55 m/s'ye değiştirilmiştir. Hareketlilik için serbest bırakma süresi 500 µs, trap yüksekliği 15 volt olarak ayarlanmıştır. Trap

serbest bırakıldıktan sonra hareketlilik ayrımı için IMS dalga gecikmesi 1000 μ s'dir (80). Herhangi bir öncü iyon önseçimi olmaksızın, 50-1900 m/z aralığındaki tüm iyonlar çözünürlük modunda parçalanmıştır. Ek olarak, 100 fmol/ μ l Glu-1-fibrinopeptid B, 60 sn aralıkla kilitli kütle referansı (*lock mass reference*) olarak infüze edilmiştir. İnfüze edilen iyonlar PMT (*photomultiplier tubes*) detektör kullanılarak saptanmıştır. Peptidleri tanımlamak ve miktarlandırmak için proteomik yazılım olarak Progenesis-QI (Waters, ABD) kullanılmıştır. Tüm proteinler en az üç eşsiz peptid sekansı ile tanımlanmış ve daha sonra proteinlerin p değerleri ve ekspresyon oranı hesaplanmıştır.

5.8.5. Farklılık gösteren proteinlerin sinyal yolağı analizi

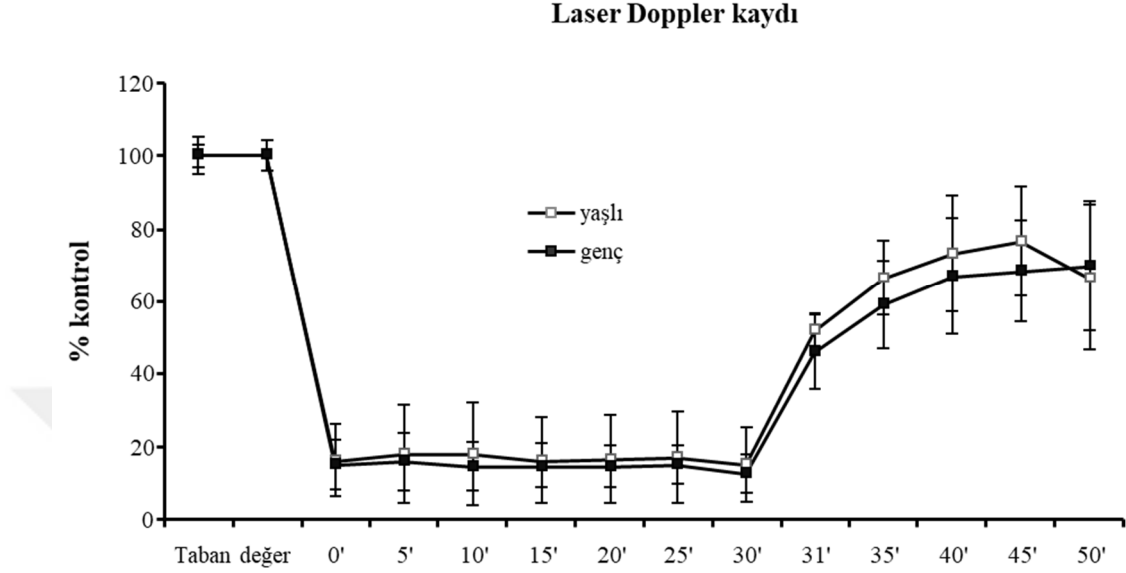
30 dakika OSA ve 72 saat reperfüzyonla indüklenen beyin felci sonrası LC-MS/MS yöntemi kullanılarak genç ve yaşlı farelerde ekspresyonu farklılık gösteren proteinler tespit edilmiştir. Tespit edilen proteinlerin hangi yolaklarda görev aldığı “*Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®)*” programı yardımıyla yazılımsal olarak belirlenmiştir.

5.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel data karşılaştırması için yazılım olarak SPSS (SPSS for Windows; SPSS Inc., USA) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar, bağımsız iki örneklem grubunun istatistiksel farkını ortaya koyabilen t testi ile hesaplanmıştır. Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma (S.S.) olarak verilmiştir. P değerleri $<0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

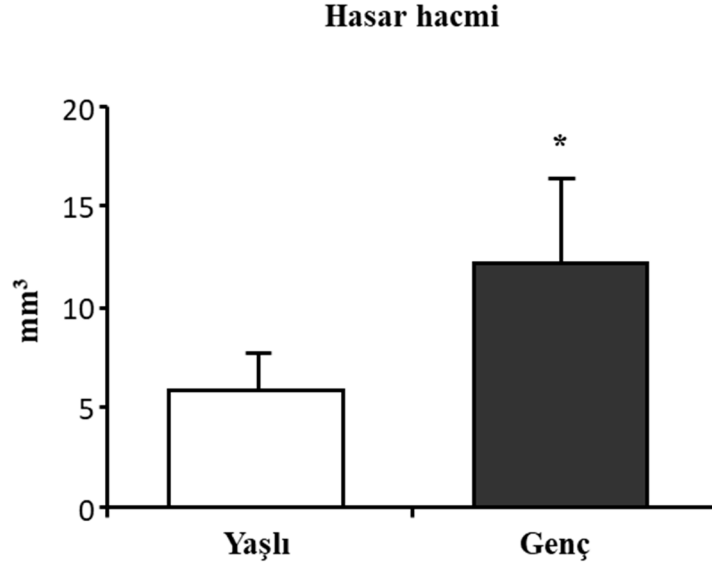
6.1. Laser Doppler Flowmetrisi ile Serebral Kan Akımının Ölçülmesi



Şekil 6.1.1. Laser Doppler kaydı. Yaşlı ve genç hayvanlarda OSA modeli ile oluşturulan iskemik beyin felci sırasında serebral kan akımı değişimi.

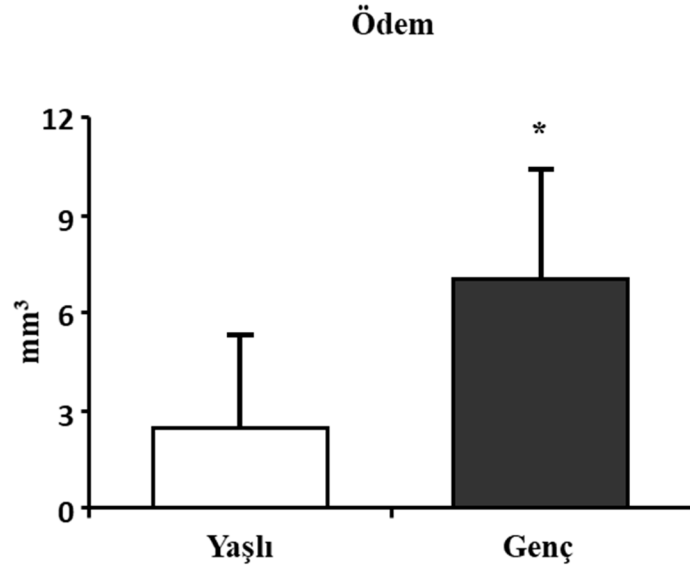
Deneyel OSA modelinin oluşturulması sırasında, oluşturulan modelin devamlılığının sağlanması, iskemi süresince oluşan hasarın kontrolü ve reperfüzyon esnasında kanlanmanın takip edilebilmesi için Laser Doppler Flowmetri (LDF) cihazı yardımıyla deney hayvanlarının striatum (bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) bölgesinden serebral kan akımları ölçülmüş ve kayıt alınmıştır. OSA ile iskeminin indüklenmesinden yaklaşık 15 dakika önce serebral kan akımı ölçümlerine başlanmış, 30 dakika iskemi süresince ve reperfüzyonun ilk 20 dakikasında kayıt alınmaya devam edilmiştir. LDF kaydına bakıldığında yaşlı ve genç hayvanların iskemi başlangıcına göre kan akımlarında yaklaşık %80'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Kan akımları düştükten sonra, iskemi süresince her iki grupta da kan akımı sabit seyretmiştir. Filamentin geri çekilmesiyle iskemi sonlandırılıp reperfüzyon başlatıldığında ise kan akımlarında parabolik olarak bir artış görülmektedir. 30 dakika OSA, 72 saat reperfüzyon uygulanan yaşlı ve genç deney hayvanları arasında serebral kanlanma bakımından iskemi öncesinde, iskemi devam ederken ve reperfüzyon sırasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 6.1.1.).

6.2. Cresyl Violet Boyaması ile Hasar Analizi



Şekil 6.2.1. Hasar hacminin değerlendirilmesi. Yaşlı ve genç hayvanlarda iskemik beyin felci sonrasında oluşan hasar hacminin belirlenmesi. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ yaşlı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

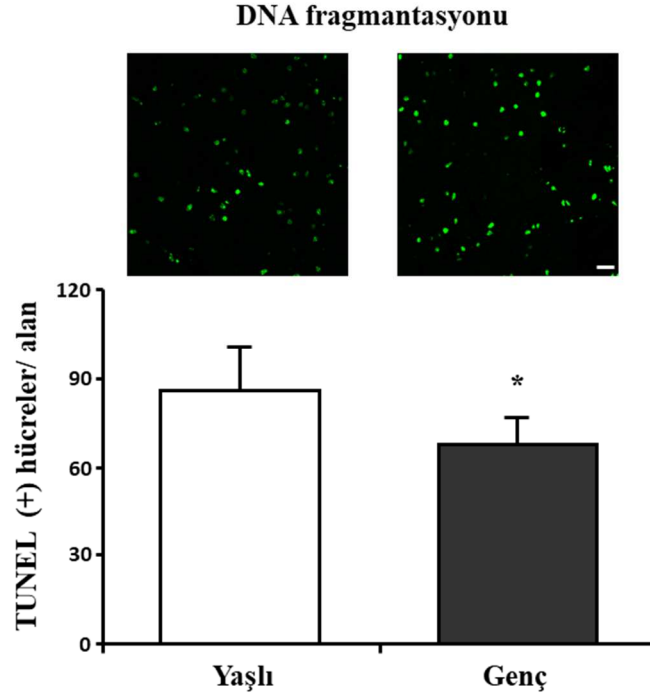
Hasar hacminin belirlenebilmesi için yaşlı ve genç hayvanlardan izole edilen beyinlerden striatum seviyesinden hasarın başından, ortasından ve sonundan alınan 18 μ m kalınlığındaki kesitlere *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası kesitler tarayıcı ile taranmış ve hasar alanının sınırları Image J programı yardımıyla belirlenmiş, hasarlı bölgeler ölçülmüş ve grupların ortalaması alınmıştır. Yapılan analiz sonucunda, yaşlı hayvanların iskemik beyin felcine karşı genç hayvanlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az hasar geliştirdikleri görülmüştür. (Şekil 6.2.1.).



Şekil 6.2.2. Ödemin değerlendirilmesi. Yaşlı ve genç hayvanlarda iskemik beyin felci sonrasında oluşan ödemin karşılaştırılması. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ yaşlı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Yaşlı ve genç hayvanlarda ödemin belirlenebilmesi için izole edilen beyinlerden striatum seviyesinden hasarın başından, ortasından ve sonundan alınan 18 μ m kalınlığındaki kesitlere *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Hasar alanının sınırları Image J programı yardımıyla belirlenmiş, hasarlı bölgeler ölçülmüş ve grupların ortalaması alınmıştır. Oluşan ödem hesaplaması için ipsilateral hemisferin alanından kontralateral hemisferin alanı çıkartılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, genç hayvanlarda iskemi sonrası yaşlı hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ödem olduğu görülmüştür (Şekil 6.2.2.).

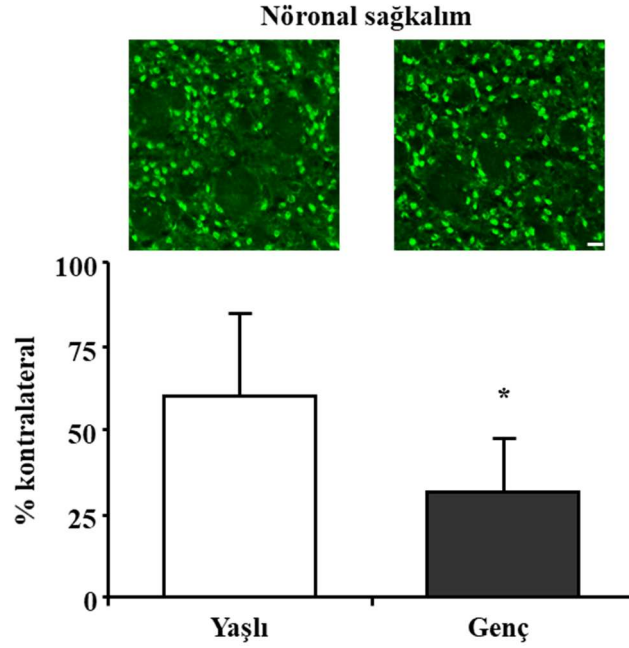
6.3. DNA Fragmentasyon Analizi ile Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi



Şekil 6.3.1. Yaşlı ve genç farelerde iskemik beyin felci sonrası apoptotik hücre sayısı. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ yaşlı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dakika OSA ve sonrasında 72 saat reperfüzyon uygulanan yaşlı ve genç farelerin beyinlerinden kryostat cihazı ile striatum seviyesinden alınan 18 μm kalınlığındaki kesitlere apoptotik hücrelerin tespiti için *in-situ* hücre ölümü tespit kiti (*in-situ Cell Death Detection kit*) ile TUNEL boyaması yapılmıştır. Kesitler boyama sonrasında 488 nm dalga boyunda, konfokal laser mikroskop ile fotoğraflanmıştır. Görüntülerde ipsilateral striatumdan her biri 62,500 μm^2 olacak şekilde 12 rastgele alan belirlenmiş ve bu alanlarda TUNEL ile işaretlenmiş hücreler sayılmıştır. Grupların ortalaması alınmış ve apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir. Yaşlı ve genç fareler kıyaslandığında, genç farelerde indüklenen iskemi sonrası oluşan apoptotik hücre sayısının yaşlı farelere göre istatistiksel anlamlı olarak daha az olduğu görülmüştür (Şekil 6.3.1., bar 50 μm 'dir).

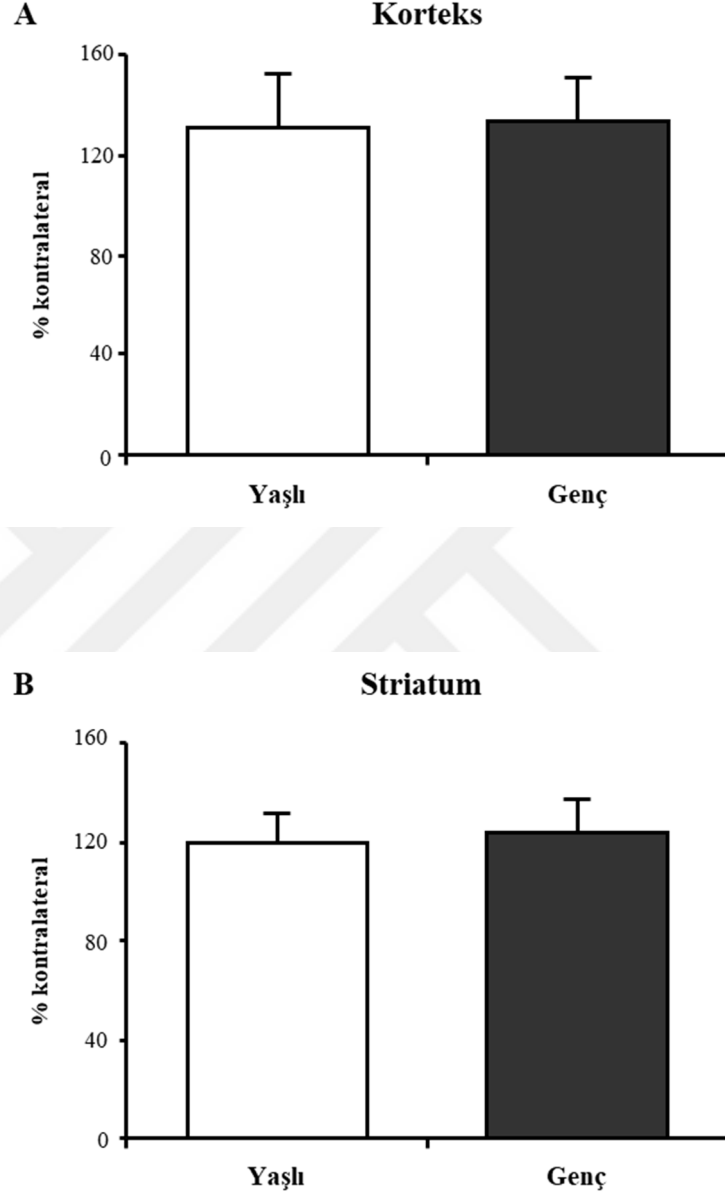
6.4. Nöronal Sağkalım Analizi



Şekil 6.4.1. Nöronal sağkalımın değerlendirilmesi. İskemik beyin felci sonrasında yaşlı ve genç farelerin nöronal sağkalım yüzdesi. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ yaşlı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dakika OSA ve 72 saat reperfüzyon uygulanan yaşlı ve genç hayvanlar arasında nöronal sağkalımda herhangi bir fark olup olmadığını görebilmek için striatum seviyesinden alınan 18 μm kalınlığındaki kesitlere immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Kesitler nöronlara özgü bir işaretçi olan NeuN antikor ve bir çekirdek boyası olan DAPI ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Boyama sonrasında kesitler Alexa Fluor 488 konjuge NeuN için 488 nm dalga boyunda laser, DAPI için ise 405 nm dalga boyunda laser kullanılarak konfokal laser mikroskop ile fotoğraflanmıştır. Değerlendirmeler, çekilen görüntüler üzerinden yapılmıştır. Hem ipsilateral hem de kontralateral striatumdan her biri 62,500 μm^2 olacak şekilde 12 rastgele alan belirlenmiş ve bu alanlarda NeuN antikor ile işaretlenmiş hücreler sayılmıştır. Nöronal sağkalım yüzdesi kontralateral hemisfere göre hesaplanmıştır. Yaşlı ve genç fareler kıyaslandığında iskemi sonrası genç farelerde nöronal sağkalımın yaşlı farelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu görülmüştür (Şekil 6.4.1., bar 50 μm 'dir).

6.5. IgG Boyaması ile Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi



Şekil 6.5.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi. İskemik beyin felci sonrasında yaşlı ve genç farelerin A) korteks ve B) striatumlarında kan beyin bariyeri geçirgenliği.

30 dakika OSAt ve 72 saat reperfüzyon ile indüklenen beyin felci sonrasında kan beyin bariyeri geçirgenliği bakımından yaşlı ve genç farelerin iskemik hemisferlerinin karşılaştırılabilmesi için 18 µm kalınlığındaki kesitlere IgG boyaması

yapılmıştır. Boyama sonrasında taratılan kesitler densitometrik olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında yaşlı ve genç farelerin hem iskemik kortekslerin de hem de striatumlarında kan beyin bariyeri geçirgenliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 6.5.1.).

6.6. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Proteinlerin Tanımlanması

OSAt modeli ile indüklenen iskemik beyin felci sonrasında yaşlı ve genç hayvanların iskemik striatum bölgelerinde birbirlerine göre değişen protein profillerinin analiz edilebilmesi için sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. Yaşlı ve genç fare dokularından elde edilen protein örneklerinden yapılan proteom analizi sonucunda toplam 1646 adet protein tespit edilmiştir. Tespit edilen proteinlerin arasından 107 adet proteinin en az gruplar arası 1,4 kat, $p < 0,05$ ya da $p < 0,01$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

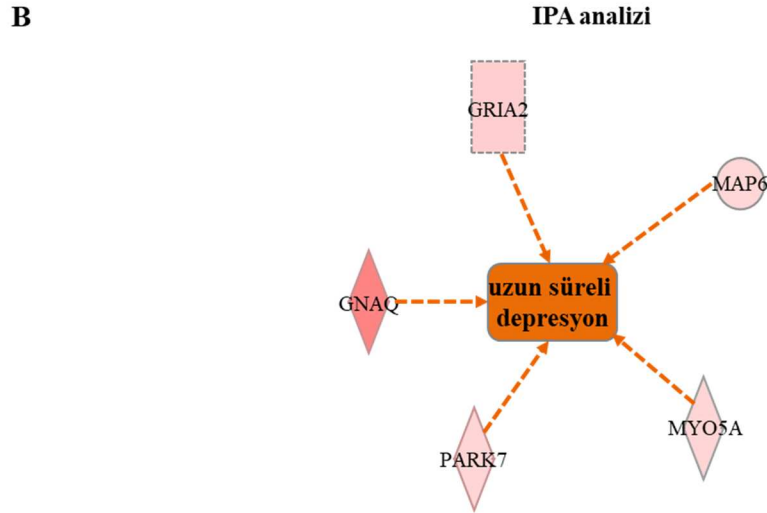
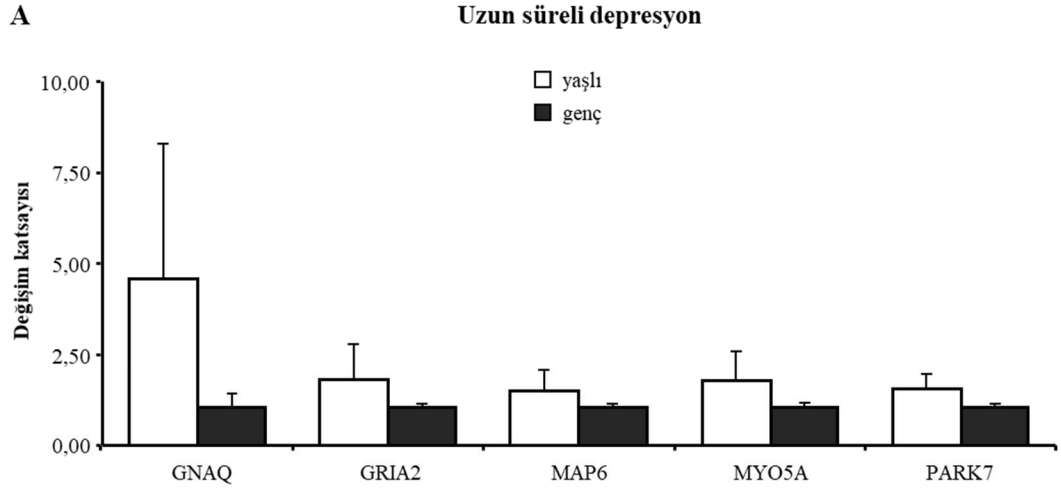
Tablo 6.6.1. Yaşlı ve genç hayvanların iskemik striatumlarında istatistiksel olarak anlamlı değişen proteinlerin listesi. “DK” değişim katsayısını ifade etmektedir.

Erişim Kodu	Protein Adı, Kısaltması	Anova (p)	DK	Yüksek
Q7TQF7	Amphiphysin, AMPH	0,015	1,70	Yaşlı
Q8VHG2	Angiomotin, AMOT	0,026	1,54	Genç
Q9CXJ4	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial, ABCB8	0,023	1,55	Yaşlı
Q9JKC6	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1, CEND1	0,007	2,08	Yaşlı
Q61330	Contactin-2, CNTN2	0,004	2,00	Yaşlı
P97315	Cysteine and glycine-rich protein 1, CSRP1	0,000	9,01	Yaşlı
Q9DCT8	Cysteine-rich protein 2, CRIP2	0,000	2,10	Yaşlı
Q8BZN6	Dedicator of cytokinesis protein 10, DOCK10	0,023	1,86	Yaşlı
Q62418	Drebrin-like protein, DBNL	0,001	2,67	Genç
Q8BZ98	Dynamin-3, DNM3	0,003	1,54	Genç
Q8CHT1	Ephexin-1, NGEF	0,008	1,49	Yaşlı
P48318	Glutamate decarboxylase 1, GAD1	0,023	2,35	Yaşlı
P23819	Glutamate receptor 2, GRIA2	0,004	1,81	Yaşlı
P48774	Glutathione S-transferase Mu 5, GSTM5	0,006	1,41	Genç
Q61016	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7, GNG7	0,004	1,48	Yaşlı
P21279	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha, GNAQ	0,000	4,57	Yaşlı
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein, HSPA8	0,003	1,43	Yaşlı
P70349	Histidine triad nucleotide-binding protein 1, HINT1	0,000	4,41	Yaşlı
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic, MDH1	0,013	1,41	Yaşlı
Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6, MAP6	0,018	1,49	Yaşlı
O08539	Myc box-dependent-interacting protein 1, BIN1	0,002	2,03	Yaşlı
P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS	0,004	1,49	Yaşlı
Q9CWS0	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, DDAH1	0,004	2,03	Genç

P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1, SLC9A3R1	0,001	1,75	Yaşlı
P08553	Neurofilament medium polypeptide, NEFM	0,028	1,44	Yaşlı
P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a, GPM6A	0,012	1,43	Yaşlı
Q4KMM3	Oxidation resistance protein 1 , OXR1	0,008	1,54	Yaşlı
Q9Z0P4	Paralemmin-1, PALM	0,005	1,56	Yaşlı
Q7M6Y3	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein, PICALM	0,006	1,50	Yaşlı
Q6Q477	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4, ATP2B4	0,002	2,22	Yaşlı
Q9QXV0	ProSAAS, PCSK1N	0,014	1,69	Yaşlı
Q99LX0	Protein deglycase DJ-1, PARK7	0,007	1,53	Yaşlı
Q91V89	Protein Ppp2r5d, PPP2R5D	0,009	2,03	Genç
Q9QZX7	Serine racemase, SRR	0,029	1,40	Genç
Q9JLM8	Serine/threonine-protein kinase, DCLK1	0,006	1,44	Genç
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn], SOD1	0,004	2,63	Yaşlı
O35526	Syntaxin-1A, STX1A	0,026	1,60	Yaşlı
Q9JKK7	Tropomodulin-2, TMOD2	0,005	1,60	Yaşlı
Q99104	Unconventional myosin-Va, MYO5A	0,001	1,78	Yaşlı

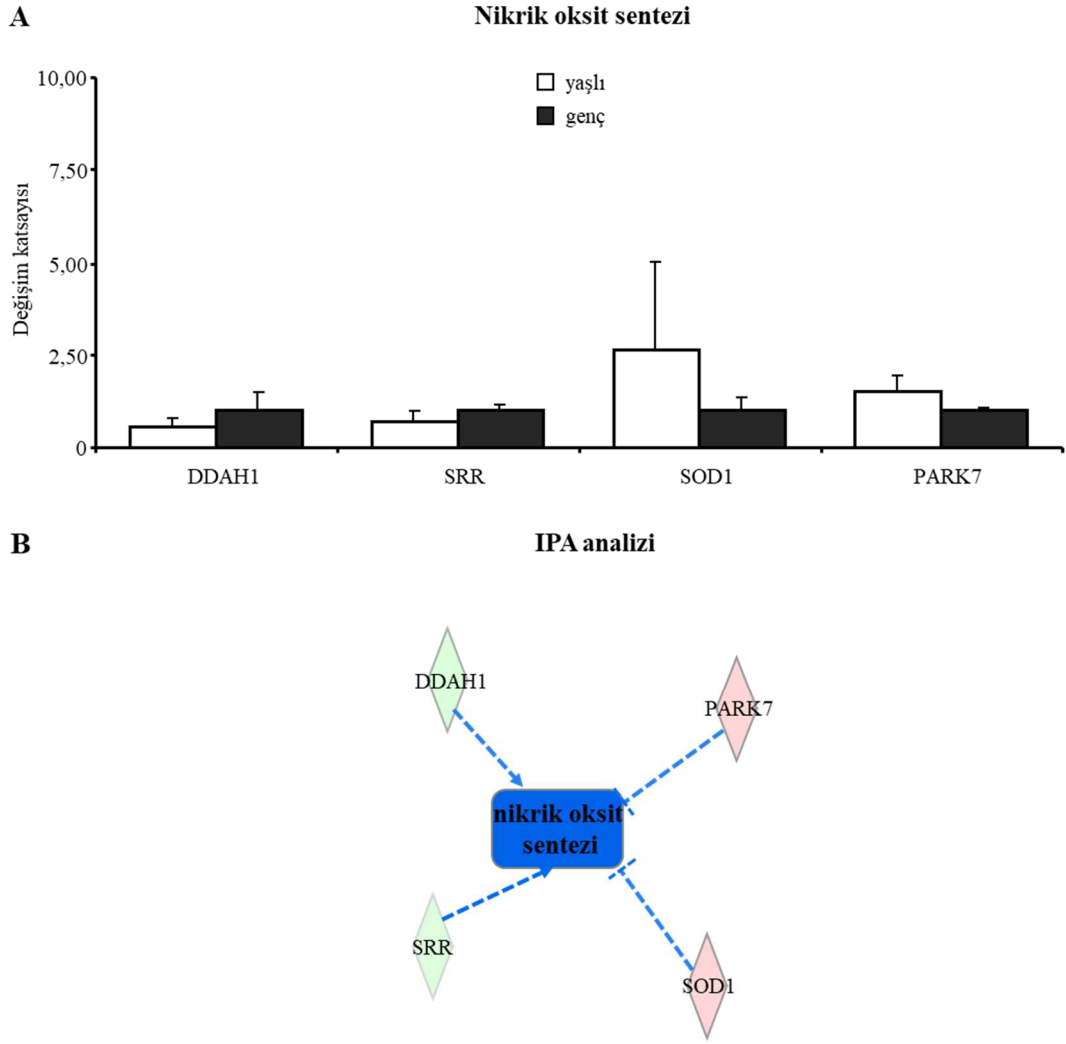
6.7. Sinyal Yolağı Analizleri

Sinyal yolağı analizi (IPA, *Ingenuity Pathway Analysis*, QIAGEN, ABD) programı kullanılarak gruplar arası değişen, protein miktar verilerine göre tespit edilen proteinlerin ait olduğu yolaklar tahmin edilmeye çalışılmıştır. IPA programı literatürdeki bilgilerden yola çıkarak değişim gösteren proteinleri çeşitli başlıklar altında gruptandırmıştır. Yaşlı ve genç hayvanlar arasında iskemi sonrası anlamlı farklılık gösteren proteinlerin IPA tarafından ilişkili olabileceği tespit edilmiş yolaklar şunlardır: Uzun süreli depresyon, nitrik oksit sentezi, nöbet geçirme, hareket kabiliyeti, kas hücre ölümü, hücresel uzantıların oluşması, mikrotübül hareketi, hücre iskeleti organizasyonu, uzun süreli depresyon, hareket bozuklukları ve koordinasyon.



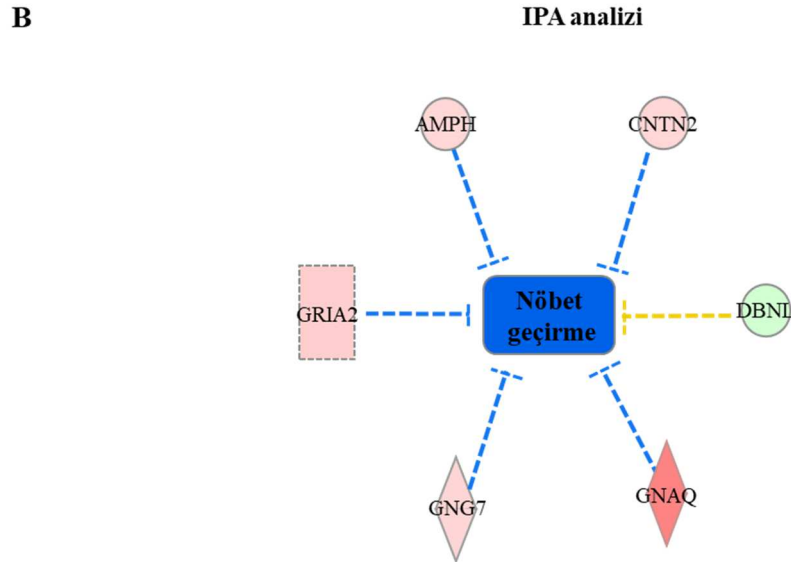
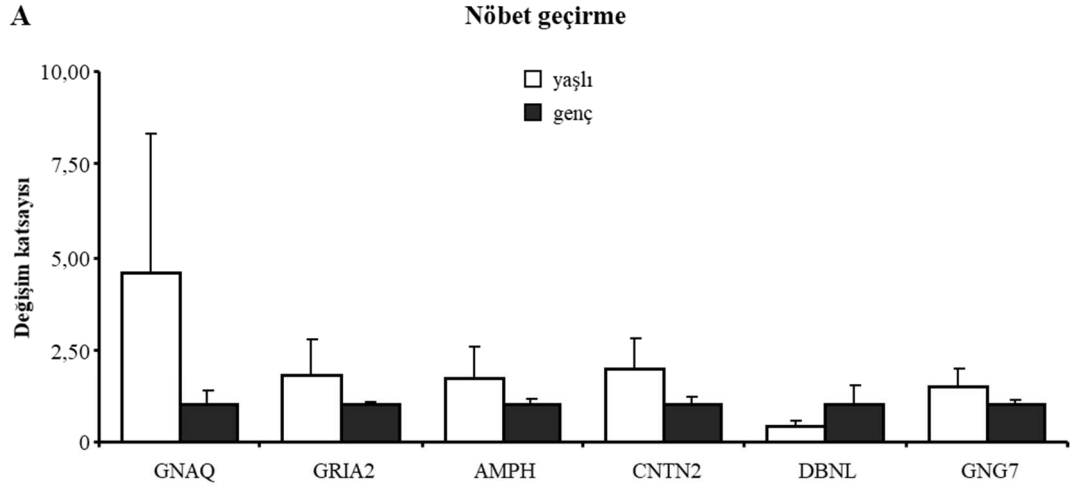
Şekil 6.7.1. İskemi sonrası uzun süreli depresyonla ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda uzun süreli depresyonla ilişkilendirilmesi.

Yaşlı farelerin iskemik striatularından tanımlanan GNAQ, GRIA2, MAP6, MYO5A ve PARK7 proteinlerinin genç hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği görülmüştür. IPA analizi bu proteinlerin uzun süreli depresyonun aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 6.7.1.).



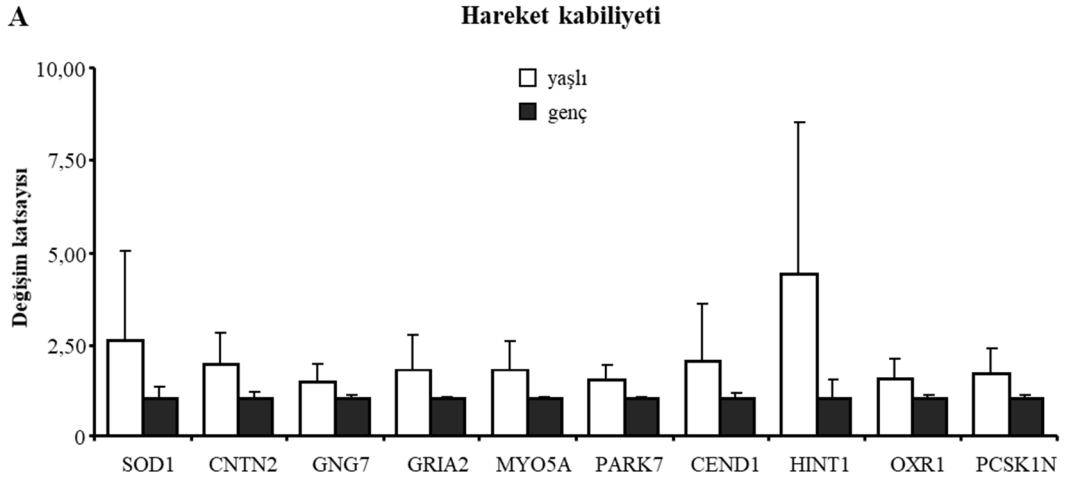
Şekil 6.7.2. İskemi sonrası nitrik oksit sentezi ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda nitrik oksit sentezi ile ilişkilendirilmesi.

Tanımlanan DDAH1 ve SRR proteinlerinin yaşlı farelerin iskemik striatumlarında gençlere göre istatistiksel olarak daha az ifade edildiği görülmüştür. Buna nazaran SOD1 ve PARK7 proteinleri yaşlı farelerin iskemik striatumunda genç farelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edilmektedir. IPA analizinin sonucuna göre DDAH1 ve SRR proteinlerinin az ifade ediliyor olması, SOD1 ve PARK7 proteinlerinin ise fazla ifade ediliyor olması yaşlı farelerde nitrik oksit sentezini genç farelere kıyasla azaltmaktadır (Şekil 6.7.2.).



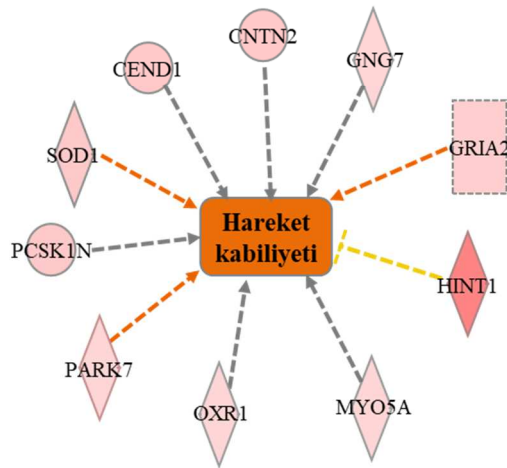
Şekil 6.7.3. İskemi sonrası nöbet geçirme ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda nöbet geçirme ile ilişkilendirilmesi.

GNAQ, GRIA2, AMPH, CNTN2, DBNL ve GNG7, Progenesis-QI tarafından tanımlanan ve IPA tarafından nöbet geçirme ile dolaylı olarak ilişkilendirilen proteinlerdendir. Nöbet geçirmeyi engelleyen GNAQ, GRIA2, AMPH, CNTN2 ve GNG7 proteinlerinin ifadelerinin yaşlı farelerin iskemik striatumlarında genç farelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği görülmüştür. DBNL proteini ise genç farelerin iskemik striatumlarında daha fazla ifade edilmektedir (Şekil 6.7.3.).



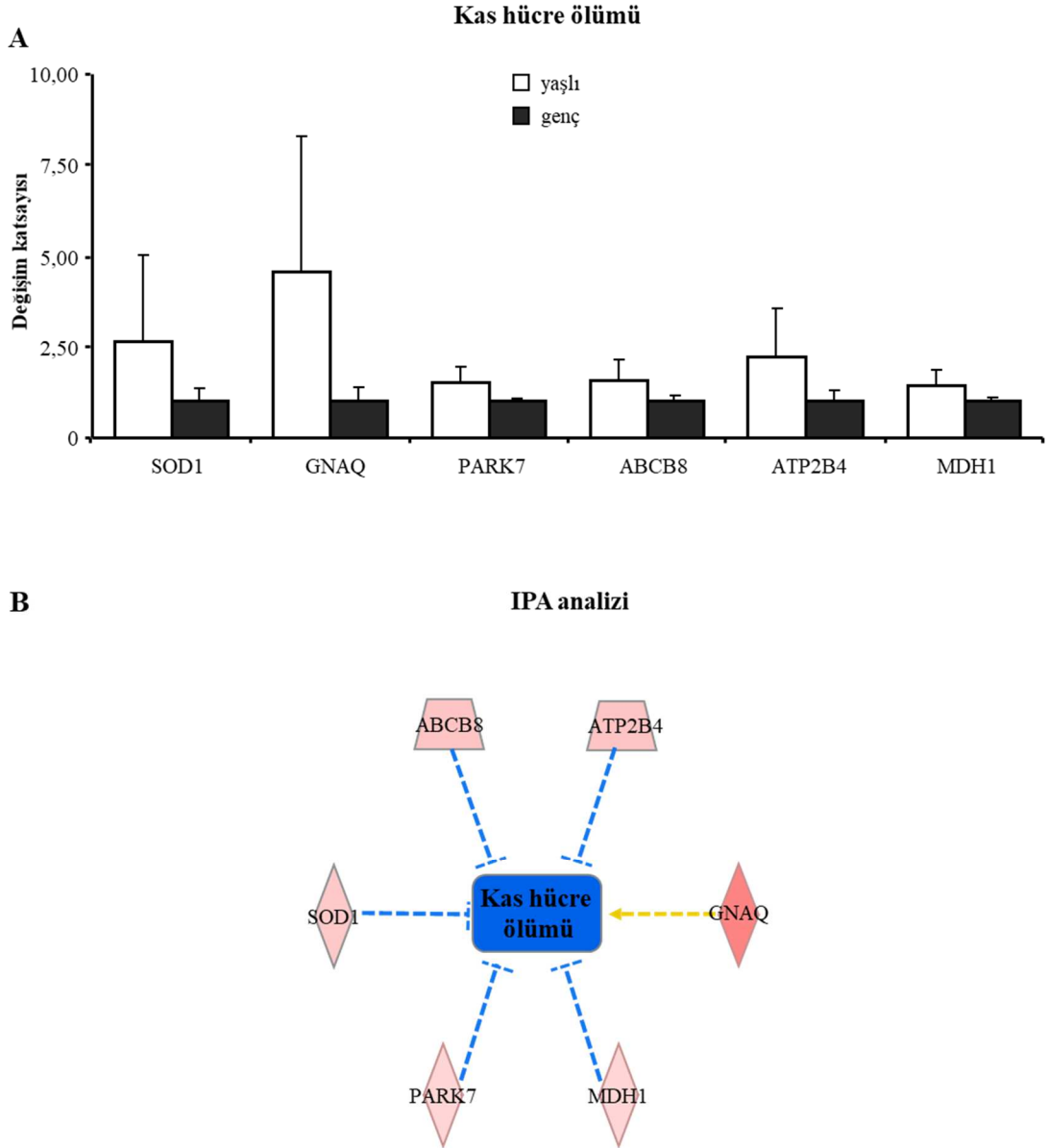
B

IPA analizi



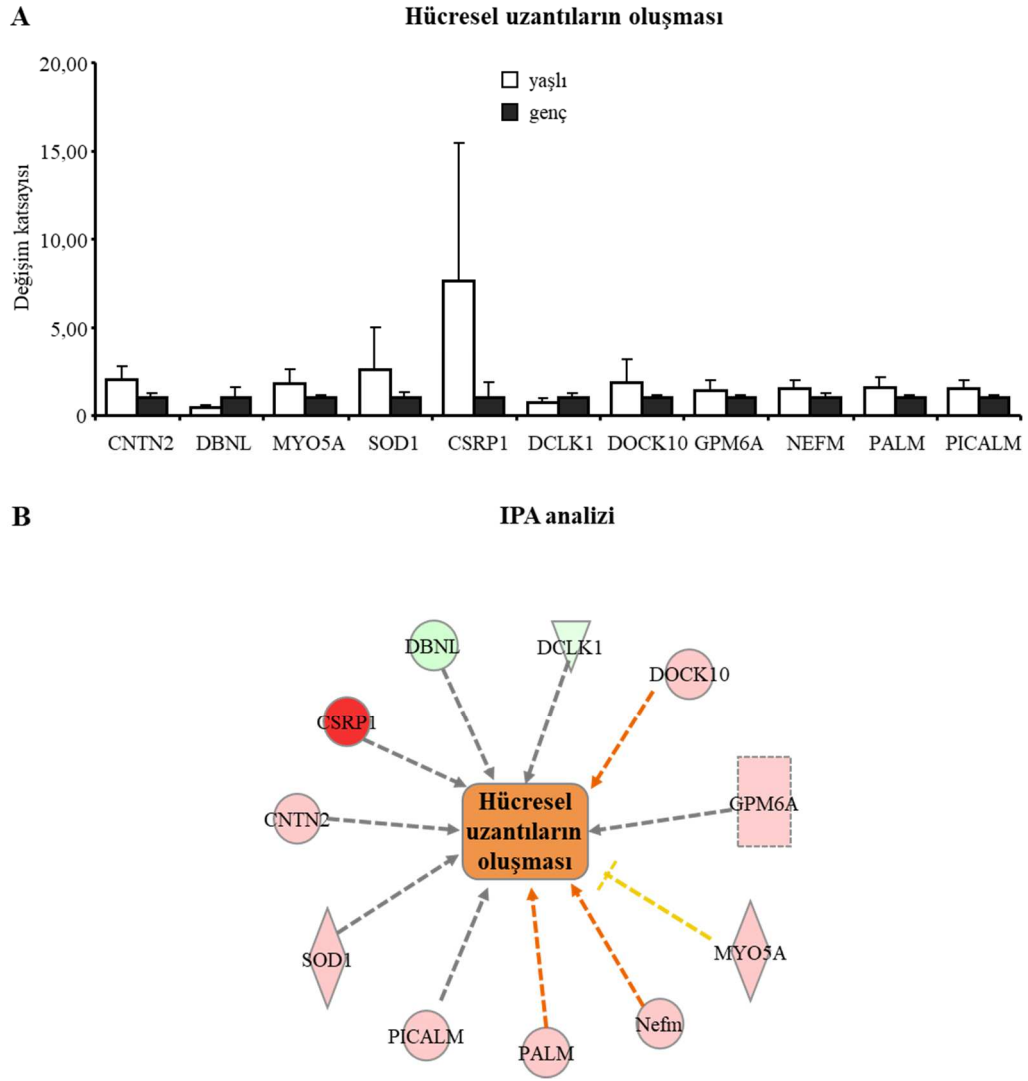
Şekil 6.7.4. İskemi sonrası hareket kabiliyeti ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda hareket kabiliyeti ile ilişkilendirilmesi.

Tanımlanmış proteinler arasından SOD1, CNTN2, GNG2, GRIA2, MYO5A, PARK7, CEND1, HINT1, OXR1 ve PCSK1N proteinleri IPA yazılımı tarafından hareket kabiliyeti (lokomasyon) ile ilişkilendirilmiş ve bu grupta bulunan bütün proteinlerin yaşlı hayvanların iskemik striatумlarında gençlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği görülmüştür. Aynı zamanda IPA bu proteinlerin ifadesinde olan artışın hareket kabiliyetini arttırdığını belirtmiştir (Şekil 6.7.4.).



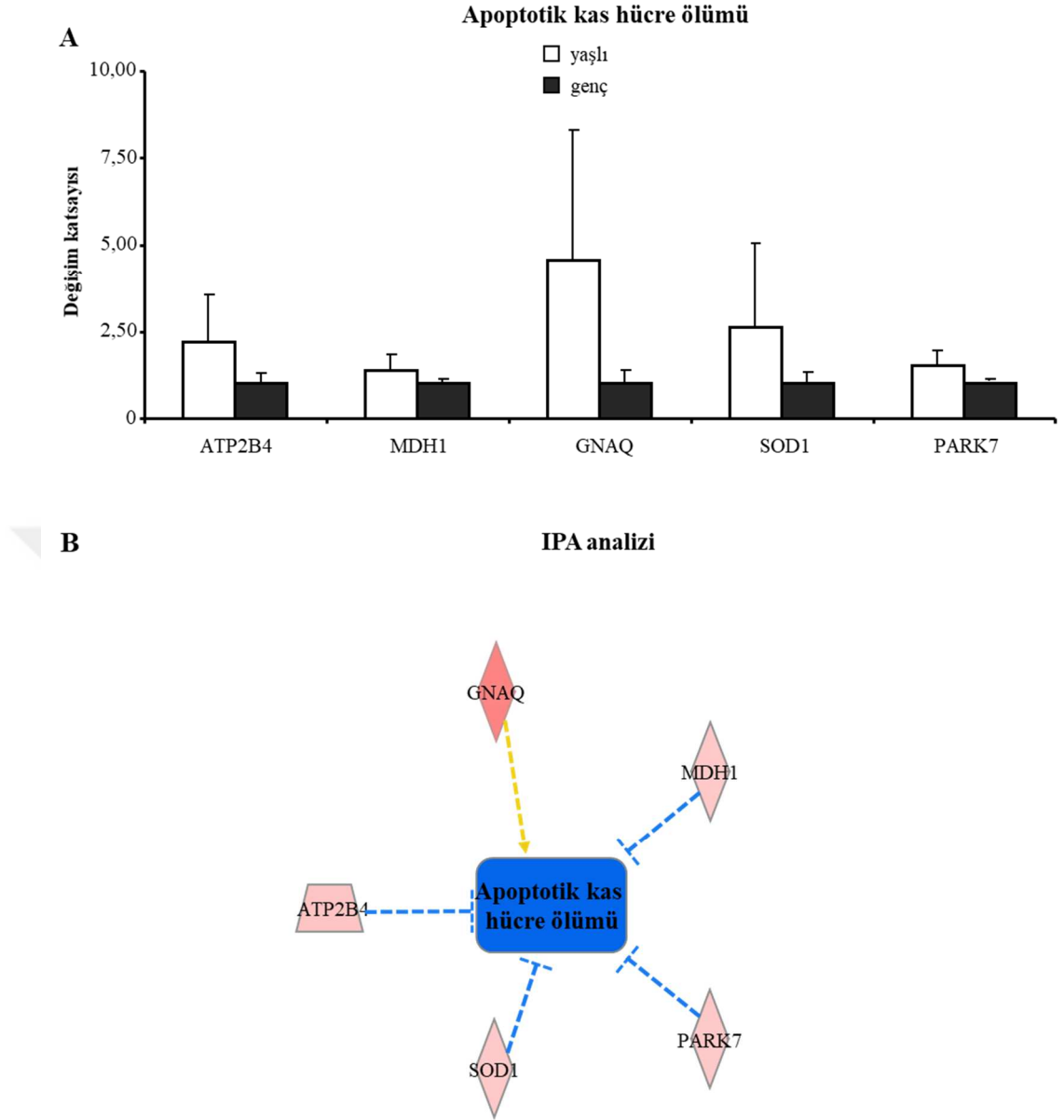
Şekil 6.7.5. İskemi sonrası kas hücresi ölümü ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda kas hücresi ölümüyle ilişkilendirilmesi.

SOD1, GNAQ, PARK7, ABCB8, ATP2B4 ve MDH1 proteinlerinin ifadesi yaşlı hayvanların iskemik striatumda genç farelerin iskemik striatumlarına göre anlamlı olarak daha fazla ifade edilmiştir. Bu proteinler IPA tarafından kas hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 6.7.5.).



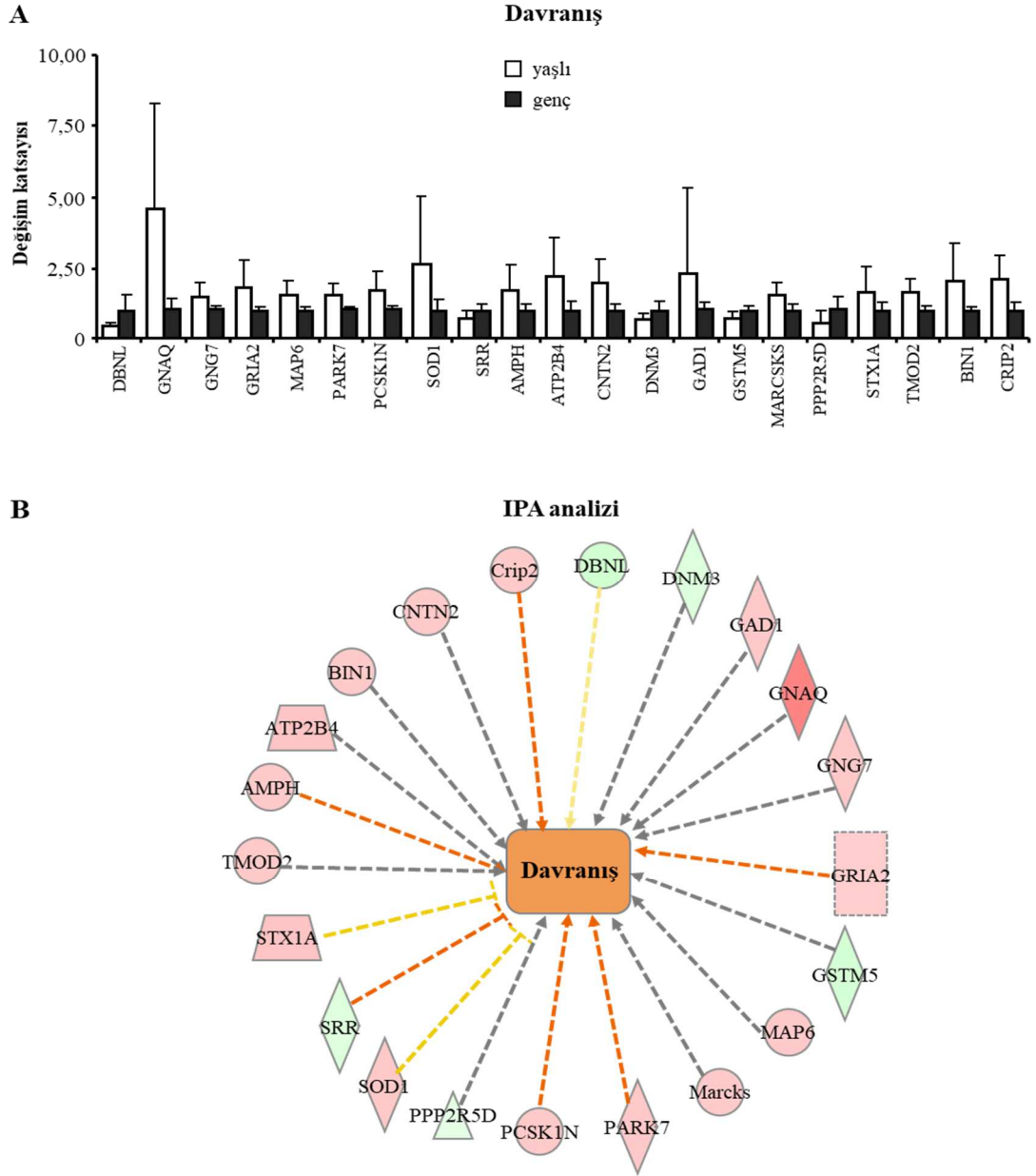
Şekil 6.7.6. İskemi sonrası hücresel uzantıların oluşumu ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda hücresel uzantıların oluşumu ile ilişkilendirilmesi.

IPA tarafından hücresel uzantıların oluşumu ile ilişkilendirilmiş proteinlerden CNTN2, MYO5A, SOD1, CSRP1, DOCK10, GPM6A, NEFM, PALM ve PICALM yaşlı farelerin iskemik striatumlarında genç farelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edilmiştir. Yine hücresel uzantıların oluşumu ile ilişkilendirilmiş DBNL ve DCLK1'in yaşlı farelerin iskemik striatumlarında istatistiksel anlamlı olarak daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.6.).



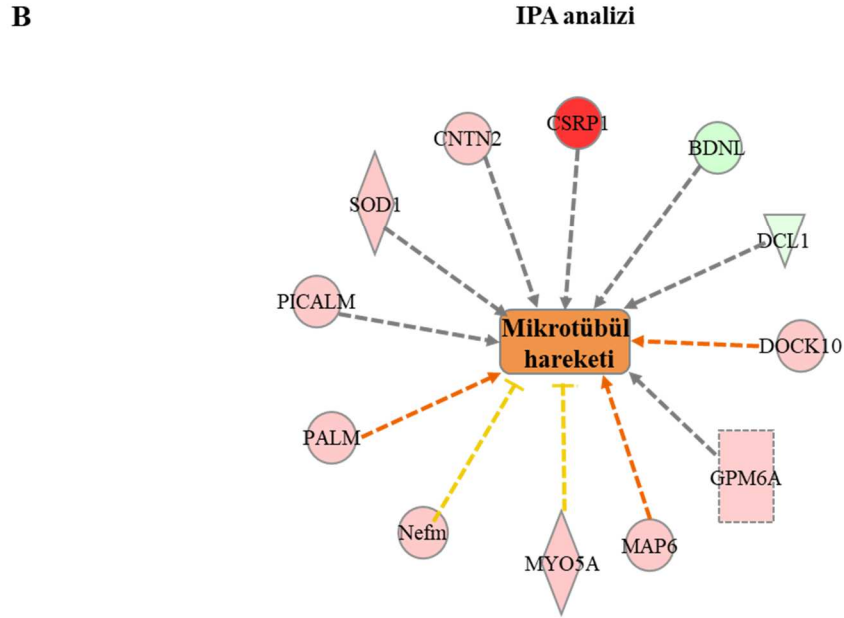
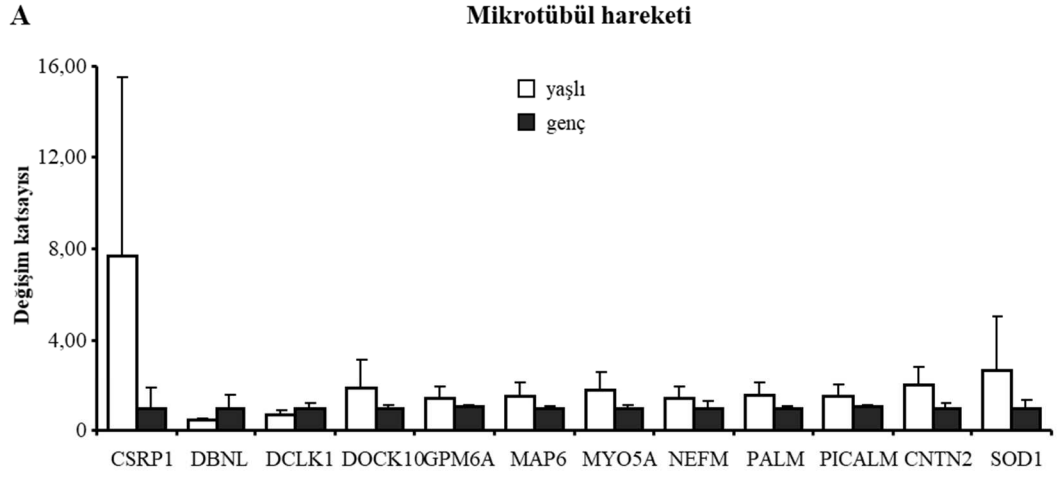
Şekil 6.7.7. İskemi sonrası apoptotik kas hücresi ölümü ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda apoptotik kas hücresi ölümü ile ilişkilendirilmesi.

Kas hücrelerinin apoptotik ölüm yolağına girmesini engellemeyeyle ilişkili bulunan ATP2B4, MDH1, GNAQ, SOD1 ve PARK7 proteinleri iskemi ile beyin felci indüklenen yaşı hayvanların iskemik striatlarında iskemi geçirmiş genç hayvanlara göre istatistiksel olarak daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.7.).



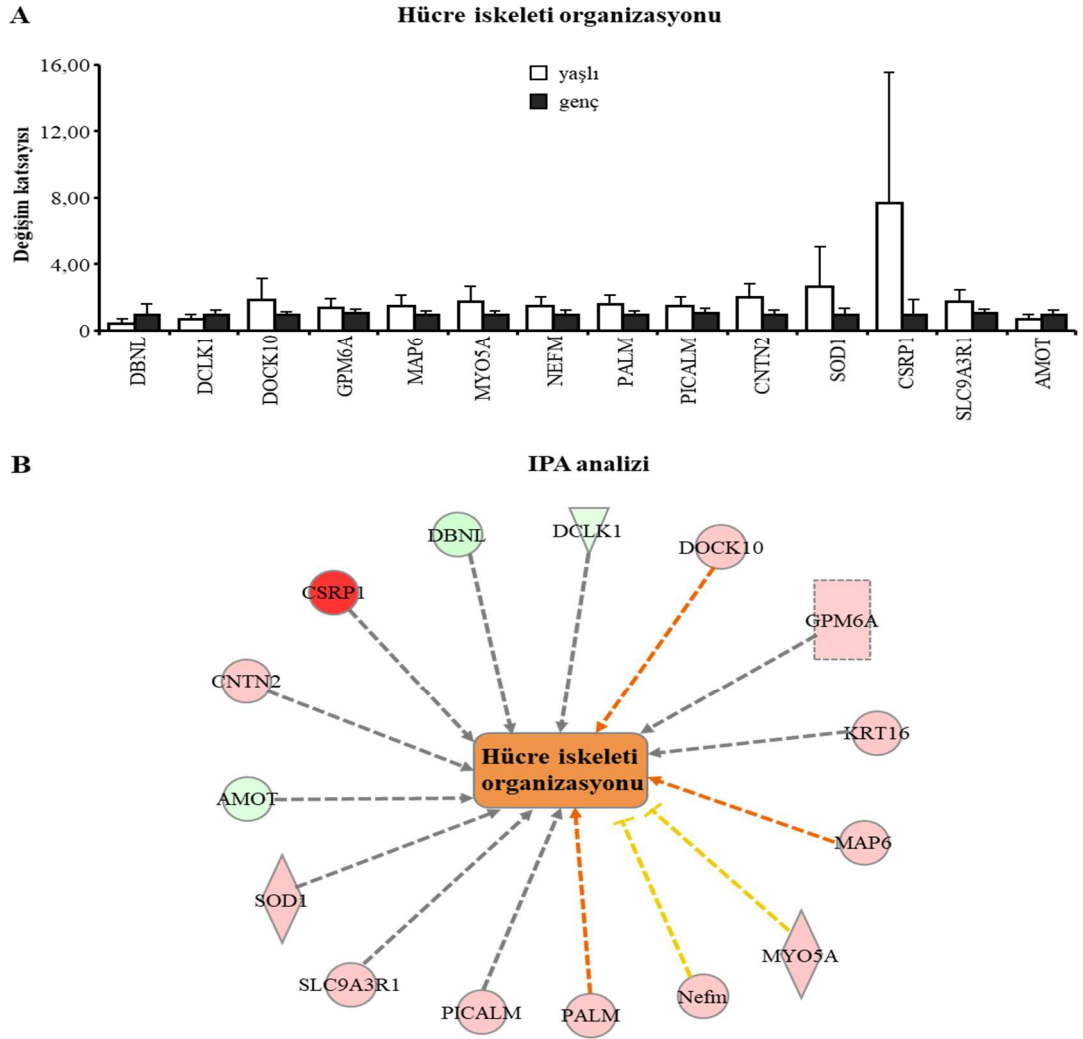
Şekil 6.7.8. İskemi sonrası davranış ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda davranış ile ilişkilendirilmesi.

IPA tarafından davranışla ilişkilendirilmiş DBNL, SRR, DNM3, GSTM5 ve PPP2R5D proteinleri yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edilirken; bu gruba dahil olan GNAQ, GNG7, MAP6, PARK7, PCSKIN, SOD1, AMPH, ATP2B4, CNTN2, GAD1, MARCKS, STX1A, TMOD2, BIN1 ve CRIP2 proteinlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.8.).



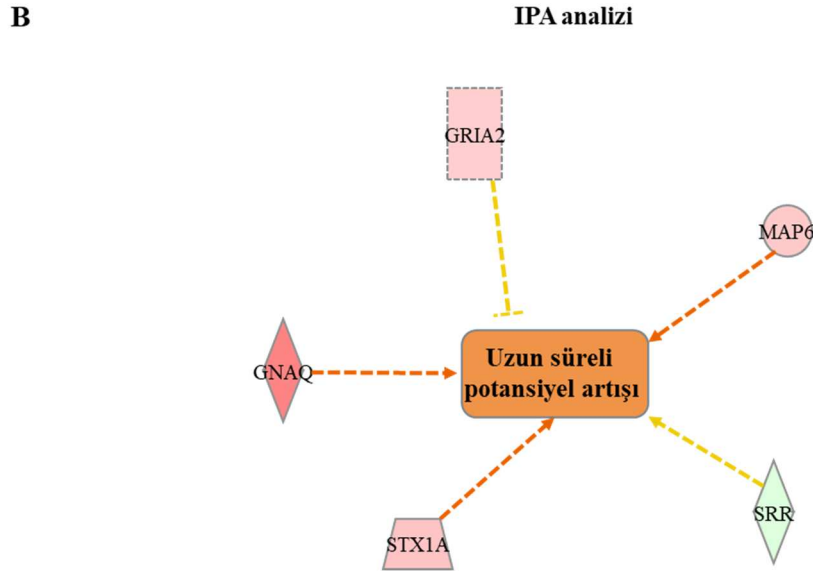
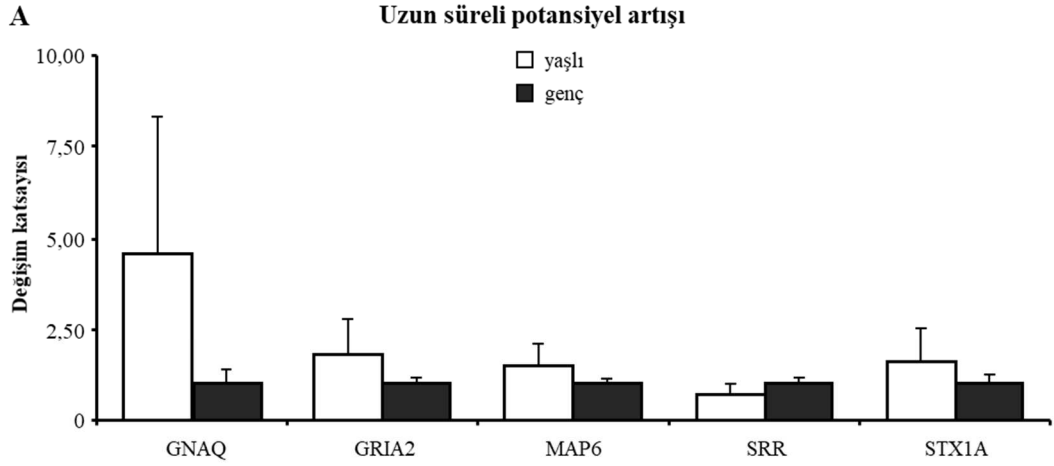
Şekil 6.7.9. İskemi sonrası mikrotübül dinamiği ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda mikrotübül dinamiği ile ilişkilendirilmesi.

Mikrotübül dinamiği ile ilişkili olduğu düşünülen tanımlanmış proteinlerden DBNL ve DCLK1 proteinleri yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edildiği görülmüştür. Mikrotübül dinamiğini etkilediği düşünülen CSRP1, DOCK10, GPM6A, MAP6, MYO5A, NEFM, PALM, PICALM, CNTN2 ve SOD1 proteinleri ise iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşlı hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 6.7.9.).



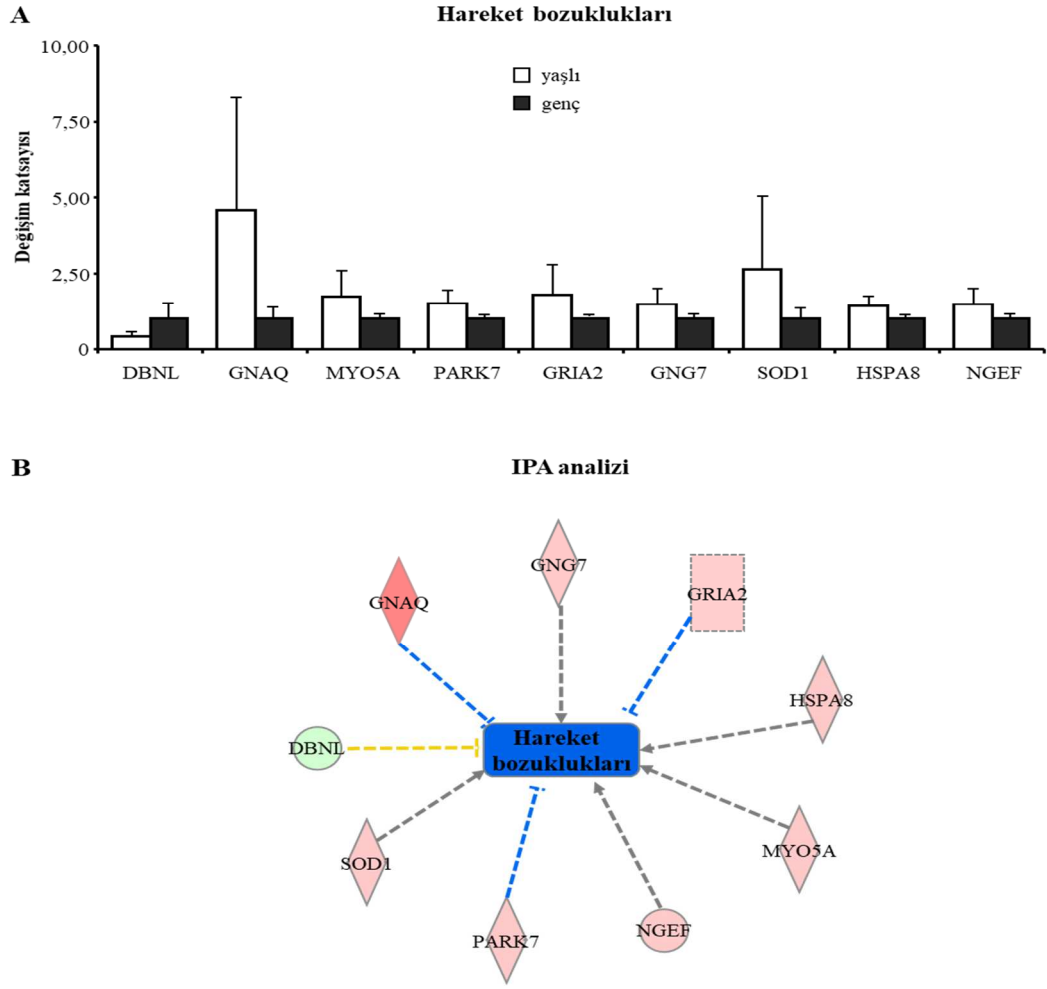
Şekil 6.7.10. İskemi sonrası hücre iskeleti organizasyonu ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda hücre iskeleti organizasyonu ile ilişkilendirilmesi.

IPA programı tarafından hücre iskeletinin organize olmasıyla ilişkilendirilen proteinler DBNL, DCLK1, DOCK10, GPM6A, MAP6, MYO5A, NEFM, PALM, PICALM, CNTN2, SOD1, CSRP1, SLC9A3R ve AMOT'tur. Bu proteinlerin arasından yalnızca DBNL, DCLK1 ve AMOT istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara göre daha az ifade edildiği görülmüştür. Hücre iskeletinin organize olmasıyla ilişkilendirilmiş diğer proteinler yaşlı hayvanlarda gençlere göre istatistiksel olarak daha fazla ifade edildiği saptanmıştır (Şekil 6.7.10.).



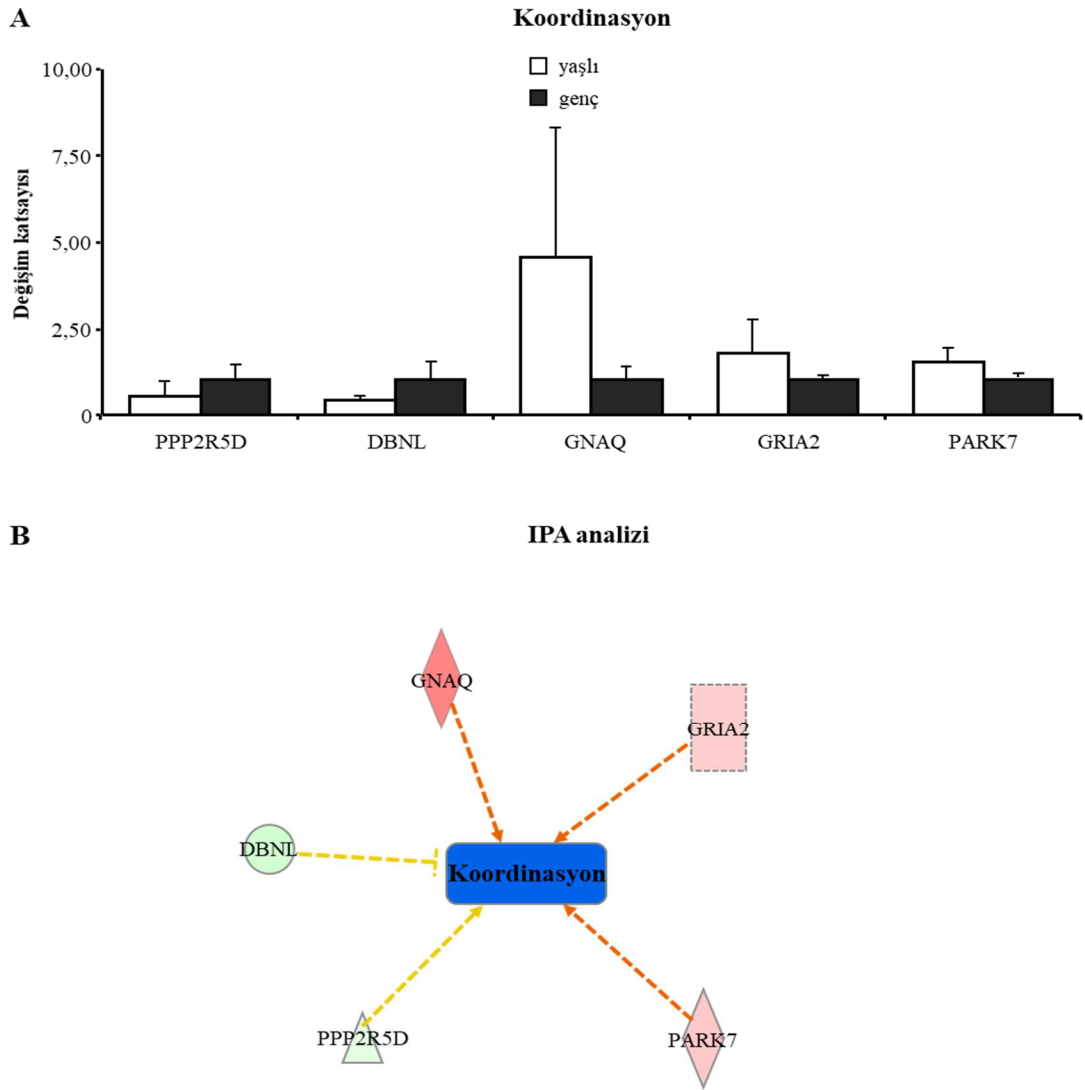
Şekil 6.7.11. İskemi sonrası uzun süreli potansiyel artışı ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda uzun süreli potansiyel artışıyla ilişkilendirilmesi.

Tanımlanan GNAQ, GRIA2, MAP6 ve STX1A proteinleri iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşlı hayvanların iskemik striatularında genç hayvanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği görülmüştür. SRR ise yaşlı hayvanların iskemik striatularında genç hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edildiği saptanmıştır. IPA programı bu paterni uzun süreli potansiyel artışı ile ilişkilendirmiştir (Şekil 6.7.11.).



Şekil 6.7.12. İskemi sonrası hareket bozuklukları ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşlı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda hareket bozukluklarıyla ilişkilendirilmesi.

DBNL proteininin azalması, GNAQ, MYO5A, PARK7, GRIA2, GNG7, SOD1, HSPA8 ve NGEF proteinlerinin artması IPA tarafından hareket bozukluklarının baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu protein grubu arasından DBNL proteini yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edildiği görülmüştür. Bu mekanizmayla ilişkilendirilmiş diğer 8 protein ise yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlarla karşılaştırıldığında daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 6.7.12.).



Şekil 6.7.13. İskemi sonrası koordinasyon ile ilgili anlamlı olarak değişen proteinler. A) İskemik striatumda tanımlanan proteinlerin yaşı ve genç hayvanlar arasındaki kat değişimleri, B) tanımlanan proteinlerin IPA analizi sonucunda koordinasyonla ilişkilendirilmesi.

İfadesinin artması IPA tarafından koordinasyonun artması ile ilişkilendirilmiş PPP2R5D, DBNL, GNAQ, GRIA2 ve PARK7 proteinlerinden PPP2R5D ve DBNL proteinlerinin genç hayvanların iskemik striatularına göre yaşı hayvanların iskemik striatularında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az ifade edildiği görülmüştür. GNAQ, GRIA2 ve PARK7 proteinleri ise iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşı hayvanların iskemik striatularında genç farelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ifade edildiği saptanmıştır (Şekil 6.7.13.).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemik beyin felci, beyne besin ve oksijen taşıyan kan damarlarının yırtılması ya da tıkanması sonucu serebral kan akımının bozulmasıyla ortaya çıkan, yaşlılarda gençlere göre daha sık görülen bir hastalıktır (7). İskemik beyin felci ile gelişen patofizyoloji, deney hayvanları ile gerçekleştirilen çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu süreçte iskemi sonrası ortaya çıkan eksitotoksisite, indüklenmiş oksidatif stres ve enflamasyon gibi birçok patolojik yolakla ilgili çözümler geliştirilmiştir (81, 82). Araştırmacılar tarafından ortaya atılan iyileştirmeye yönelik çözüm önerileri, çoğu zaman deneysel iskemi çalışmalarında başarılı olsa da translasyonel klinik çalışmalarda başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu çalışmaların başarısızlıkla sonuçlanmasının birçok sebebi olduğu düşünülmektedir (36). Klinik öncesi araştırmalar tasarlanırken, hastada iskemik beyin felcine karşı gelişen patofizyolojik yanıtı laboratuvar ortamında tam anlamıyla taklit edebilen iskemik beyin felci hayvan modellerinin eksikliği, deneysel çalışmaların kliniğe aktarılmasını zorlaştırmaktadır (83). Yaşlanmaya bağlı değişen fizyoloji ve oluşan diğer hastalıklar translasyonel iskemik beyin felci araştırmalarının kliniğe uyarlanamamasının en büyük sebeplerindendir. Araştırmalar için kullanılan çoğu model iskemik beyin felci hastalarının sahip oldukları diğer hastalıkları taşımamaktadır; dolayısı ile bu modellerde iskemik beyin felcine karşı hastalardan daha farklı patolojik yanıtlar oluşmakta, daha da önemlisi sonuçlar geliştirilen ilaçların etkileri konusunda yanıltıcı olmaktadır (84). Bütün bunlar göz önüne alınarak klinik öncesi çalışmaların kliniğe uyarlanabilmesi ve klinik çalışmalarda elde edilen sonuçların başarılı olabilmesi için yapılan deneysel çalışmalarda hastalığın çokça görüldüğü yaş aralıkları da dikkate alınmalıdır. Bu yaş aralığında uygulanan iskemik beyin felci modeli ile yaşa bağlı olarak gelişen iskemi kaynaklı patofizyolojinin iyi anlaşılması ileride tedaviye yönelik hedeflerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Bu bağlamda, yapılan bu tez çalışmasında iskemik beyin felci geçirmiş yaşlı (18-24 ay, C57BL/6j) ve genç (8-12 haftalık, C57BL/6j) fareler arasındaki i) nöronal sağkalım, ii) hasar alanı büyüklüğü, iii) apoptotik hücre sayısıiv) kan beyin bariyeri geçirgenliği ve v) protein profili farklılıkları karşılaştırılmıştır. İskemik beyin felci için *in vivo* şartlarda 30 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAt) ardından 72 saat

reperfüzyon modeli kullanılmıştır. Oluşturulan bu model, beyni besleyen damarlardan bir tanesi olan orta serebral arterin tıkanmasını içermekte ve insanda en sık meydana gelen beyin felci türü olan iskemik beyin felcinin *in vivo* olarak taklit edilmesini sağlamaktadır. Uygulanan bu model ile striatum bölgesinde hasar gelişmektedir. Bu yöntem ile gelişen hasar nispeten daha hafif olduğundan genellikle kortekse kadar ulaşmamaktadır. Fareler, akut hasarın tamamlandığı 72. saatte kurban edilmiştir.

Oluşturulan 30 dakika OSAt, ardından 72 saat reperfüzyon modeli sırasında invazif olmayan LDF yöntemi ile beyin kan akımı ölçümü yapılmıştır. Yaşlı ve genç hayvanlarda hasarın verildiği striatum bölgesindeki kanlanma, gerek kan akımının durdurulduğu 30 dakikalık sürede, gerekse reperfüzyonun ilk 20 dakikasında yerleştirilen prob aracılığı ile ölçülmüştür. Belirlenen bölgeden yapılan bu ölçüm, iske mi süresini kontrol edebilmek ve bu sayede oluşturulan hasarın miktarını belirleyebilmek amaçlı yapılmaktadır. Ayrıca yapılan ölçümler gerçekleştirilen operasyonların başarısı ve tekrarlanabilirliği hakkında fikir vermektedir (74, 75). Ölçümlerde, yaşlı ve genç hayvanların operasyon yapılan tüm setlerinde kanlanmanın iske mi başlangıcında %20'nin altına düştüğü, iske mi süresince bu oranın değişmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca reperfüzyon başlangıcından itibaren setler arasında kanlanmanın aynı oranda arttığı görülmüştür. LDF yöntemi ile ölçülen kanlanmada yaşlı ve genç hayvanlar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 6.1.1.). Bu sonuçlar, elde edilen diğer sonuçların yaşlı ve genç hayvanlardaki kanlanma farklılıklarından kaynaklanmadığına işaret etmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da iske mi süresince, iske miyi takip eden reperfüzyon sırasında yaşlı ve genç hayvan deney grupları arasında kanlanma açısından fark olmadığı belirtilmiştir (85).

OSAt modelinde 30 dakika iske mi, ardından 72 saat reperfüzyon ile oluşturulan hasar striatumla sınırlı kalmaktadır. Oluşan hasar hacmini ve ödemi ölçmek ve yaşlı ve genç hayvanlardaki hasarı birbiriyle kıyaslayabilmek için *cresyl violet* boyaması yapılmıştır (86). *Cresyl violet* boyaması canlı nöronlardaki Nissil cisimciklerini boyamaktadır. Bu boyamanın sonucunda sadece hasarsız bölgelerdeki nöronlar boyanmıştır. *Cresyl violet* boyaması hasarlı ve hasarsız bölgelerin kolaylıkla birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır (75). Böylece hasar analizi için yaşlı ve genç hayvanlarda hasarlı bölgelerin alanları ölçülmüş, grupların ortalaması alınmıştır (Şekil

6.2.1.). Ödem için ise hasara ipsilateral ve kontralateral hemisferlerin alanları ölçülmüştür (Şekil 6.2.2.). Literatürde yaşlı ve genç hayvanlarda iskemi sonrası oluşan hasarla ilgili farklı sonuçlar yer almaktadır. Bazı araştırmacıların verilerine göre, yaşlanma ile iskemiye yanıt olarak gelişen hasar artmaktadır (87, 88). Bazı çalışmalarda ise sonuçlar genç hayvanlarda gelişen hasarın yaşlı hayvanlardan daha fazla olduğu yönündedir (68, 89, 90). Bunun yanı sıra, yaşlı ve genç sıçanlarda OSA't'nin nörolojik etkisine bakmak için yapılan bir çalışma bu iki grup arasında hasar açısından herhangi bir fark olmadığını göstermiştir (91). Popa-Wagner ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmada yaşlı hayvanlarda hasar gelişiminin daha hızlı olduğunu, iskemi sonrası 3. günde hasar hacimleri karşılaştırıldığında yaşlı hayvanların hasar hacimlerinin genç hayvanlara oranla daha fazla olduğunu göstermiştir. Ancak yine aynı çalışmanın sonuçlarına bakıldığında iskemi sonrası 7. günde genç hayvanların iskemiye bağlı geliştirdikleri hasarın neredeyse yaşlı hayvanlarla aynı seviyeye geldiği görülmektedir (66). Hasar alanı gelişimi tek başına değerlendirilmemelidir. Yaşlı ve genç hayvanlar arasında görülen hasar alanı farkı birçok süreçten etkilenmiş olabilir. Örneğin, iskemi ile ilişkili apoptotik hücre ölümü sürecinin başlama süresi, nöronal hücrelerin kaybı ve beyin makrofajlarının ortamdaki ölü hücreleri temizleme süreleri hasarı belirleyen birkaç noktadır (68, 92).

İskemik beyin felci sonrasında, kan akımının kesilmesiyle iskeminin etkili olduğu çekirdek bölgede nekrotik hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak bu süreçte ve hatta bu süreci takip eden uzunca bir süre penumbra apoptotik hücre ölümlerinin devam ettiği, hasarın yayıldığı bilinmektedir (93). Yapılan bir çalışmada, yaşlanmanın beyin felcine karşı hızlı hasar alanı gelişmesine neden olduğu rapor edilmiş ve yaşlanma kötü prognozla ilişkilendirilmiş, bu durumun da hasar bölgesinde gerçekleşen apoptotik hücre ölümüyle bağlantılı olduğu belirtilmiştir (66). Fakat yaşlı ve genç sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise iskemi/reperfüzyondan 48 saat sonra gelişen apoptotik hücre sayısının yaşa bağlı olarak değişmediği vurgulanmıştır. Bu çalışmaya göre yaşlı ve genç sıçanlarda iskemi/reperfüzyon sonrasında, 48. saatte, apoptotik hücre sayısı aynı olsa da yaşa bağlı apoptotik sürecin gelişimi farklılık göstermektedir. Yine aynı çalışmanın sonuçlarına göre, 48. saatte yaşlı sıçanlar genç sıçanlara göre apoptotik sürecin erken evresindedir ve bu da yaşlı hayvanlara göre genç hayvanların daha fazla nöronal hücre kaybetmesinin nedenini açıklamaktadır (94).

Yaşlı ve genç fareler arasında apoptotik hücre ölümündeki farkı ortaya koymak için apoptoz sürecinde oluşan DNA kırıkları incelenmiştir. *In situ* hücre ölümü deteksiyon kiti (TUNEL) kullanılmış, 30 dakika OSA tıkanması, ardından 72 saat reperfüzyonu takiben ortaya çıkan apoptotik hücre ölümü değerlendirilmiştir. Bu kit apoptoz sırasında oluşan DNA kırıklarına bağlanarak apoptoza giden hücre sayısını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda yaşlı farelerde apoptoza giden hücre sayısının genç farelere göre daha fazla olduğu görülmüştür (şekil 6.3.1.).

Yaşlı ve genç farelerin ipsilateral striatumunda, iskemi sonrasında sağkalan nöron hücrelerinin sayısını belirlemek ve gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek için NeuN antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır (95). Hesaplamalarda her grubun kendi kontralateral hemisferine göre normalizasyon yapılmıştır. İmmünohistokimya boyama, yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında sağkalan nöron sayısının genç hayvanlarla kıyaslandığında daha fazla olduğunu göstermiştir (şekil 6.4.1.). Li ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada yayınladıkları verilerle iskemik beyin hasarının oluşmasından hemen sonra yaşlı hayvanlarda daha fazla oksidatif stres ve protein hasarının görüldüğünü belirtmiştir. Ek olarak, yaşlı ve genç hayvanlar arasında fokal kortikal iskemi sonrasında apoptotik hücre sayısında ve NeuN pozitif hücre sayısında fark görememişlerdir. Bunun sebebini yaşlı hayvanların beyin dokusunda oluşan, genç hayvanlara göre daha erken gelişen ve daha ağır olan iskemik yanıtın hasarın çevresinde sınır oluşturmalarıyla ve bu sınır sayesinde yaşlı hayvanlarda nöronal sağkalımın sağlandığıyla ilişkilendirmişlerdir (89). İskemi sonrası kan beyin bariyeri geçirgenliğinin belirlenebilmesi için IgG boyaması yapılmıştır. Yapılan densitometrik analiz sonucunda iskemi sonrası hem striatumda hem de kortekste yaşlı ve genç hayvanların kan beyin bariyeri geçirgenlikleri arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 6.5.1).

İskemik beyin felci sonrasında yaşlı ve genç hayvanlarda oluşan kan akımı, hasar alanı, apoptotik hücre sayısı ve nöronal sağkalım gibi patolojik yanıtların yanı sıra protein profilindeki farklılıklar da incelenmiştir. İskemi sonrası yaşlı ve genç hayvanların iskemik striatumlarından elde edilen dokularla geniş ölçekli proteomik analiz yapılmıştır. Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi ile yapılan proteomik çalışma sonucunda gruplar arasında farklılık gösteren, ekspresyonu en az 1,4 kat

değişen, $p < 0,05$ ya da $p < 0,01$ istatistiksel olarak anlamlı proteinler tanımlanmıştır (Tablo 6.6.1.). Tanımlanan proteinler, IPA yolak analizi programı kullanılarak iskemik beyin felci sonrasında prognozda etkili olabilecek önemli yolaklarla ilişkilendirilmiştir. Uzun süreli depresyon, nitrik oksit sentezi, nöbet geçirme, hareket kabiliyeti, kas hücre ölümü, hücrel uzantıların oluşumu, kas hücrelerinin apoptotik ölümü, davranış, mikrotübül dinamiği, hücre iskeleti organizasyonu, uzun süreli potansiyel artışı, hareket bozuklukları ve koordinasyon ilişkili bulunan yolaklardır.

Tanımlanan proteinlerden GNAQ, GRIA2, MAP6, MYO5A ve PARK7 proteinlerinin ifadesinin artması IPA tarafından uzun süreli depresyonun artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Uzun süreli depresyonun aktivasyonu ile ilişkili bu proteinlerin ifadesi yaşlı hayvanların iskemik striatumunda genç hayvanlara kıyasla daha fazladır (Şekil 6.7.1.). IPA analizine göre ifadesinin artması nitrik oksit sentezini aktive eden DDAH1 ve SRR proteinleri yaşlı farelerde daha az ifade edilirken, nitrik oksit sentezini baskılamakla ilişkilendirilen SOD1 ve PARK7 proteinleri genç farelere kıyasla yaşlı farelerde daha fazla ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.2.). GNAQ, GRIA2, AMPH, CNTN2, DBNL ve GNG7 proteinleri IPA tarafından nöbet geçirme ile dolaylı olarak ilişkilendirilen proteinlerdendir. Nöbet geçirmeyi engelleyen GNAQ, GRIA2, AMPH, CNTN2 ve GNG7 proteinlerinin ifadelerinin yaşlı farelerin iskemik striatumlarında genç farelere göre ifade edildiği görülmüştür. DBNL proteini ise genç farelerin iskemik striatumlarında daha fazla ifade edilmektedir (Şekil 6.7.3.). IPA analizi ile SOD1, CNTN2, GNG2, GRIA2, MYO5A, PARK7, CEND1, HINT1, OXR1 ve PCSK1N proteinlerinin ifadesinde olan artış, yazılım tarafından hareket kabiliyeti (lokomasyon) ile ilişkilendirilmiş ve bu grupta bulunan bütün proteinlerin yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında gençlere göre daha fazla ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.4.). IPA tarafından kas hücre ölümü ile ilişkilendirilmiş SOD1, GNAQ, PARK7, ABCB8, ATP2B4 ve MDH1 proteinlerinin ifadesi yaşlı hayvanların iskemik striatumda genç farelerin iskemik striatumlarına göre daha fazla ifade edilmiştir. Bu proteinlerin ifadesindeki artışın dolaylı olarak hücre ölümünü engellediği yazılım tarafından ortaya konmuştur (Şekil 6.7.5.). IPA tarafından hücrel uzantıların oluşumu ile ilişkilendirilmiş proteinlerden CNTN2, MYO5A, SOD1, CSRP1, DOCK10, GMP6A, NEFM, PALM ve PICALM genç farelerle karşılaştırıldığında yaşlı farelerin iskemik striatumlarında daha fazla ifade

edilmektedir. Yine hücrel uzantıların oluşumu ile ilişkilendirilmiş DBNL ve DCLK1 ise yaşlı farelerin iskemik striatumlarında daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.6.). Kas hücrelerinin apoptotik ölüm yolağına girmesini engellemeye ilişkin bulunan ATP2B4, MDH1, GNAQ, SOD1 ve PARK7 proteinleri iskemi ile beyin felci indüklenen yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında iskemi geçirmiş genç hayvanlara göre daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.7.). IPA tarafından davranışla ilişkilendirilmiş DBNL, SRR, DNMT3, GSTM5 ve PPP2R5D proteinleri yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara kıyasla daha az ifade edilirken; yine davranışla ilişkilendirilen GNAQ, GNG7, MAP6, PARK7, PCSKIN, SOD1, AMPH, ATP2B4, CNTN2, GAD1, MARCKS, STX1A, TMOD2, BIN1 ve CRIP2 proteinlerinin daha fazla ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.8.). Mikrotübül dinamiği ile ilişkilendirilmiş DBNL ve DCLK1 proteinleri yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara kıyasla daha az ifade edildiği görülmüştür. Mikrotübül dinamiğini etkilediği düşünülen CSRP1, DOCK10, GPM6A, MAP6, MYO5A, NEFM, PALM, PICALM, CNTN2 ve SOD1 proteinleri ise iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşlı hayvanlarda daha fazla ifade edilmektedir (Şekil 6.7.9.). DOCK10, GPM6A, MAP6, MYO5A, NEFM, PALM, PICALM, CNTN2, SOD1, CSRP1, SLC9A3R ve AMOT proteinleri IPA yazılımı ile hücre iskeletinin organize olmasıyla ilişkilendirilmiş ve yaşlı hayvanlarda gençlere göre daha fazla ifade edildiği görülmüştür. Hücre iskeleti organizasyonu ile ilişkilendirilen diğer proteinler ise DBNL, DCLK1 ve AMOT'tur. Bu proteinlerin yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara göre daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 6.7.10.). Tanımlanan GNAQ, GRIA2, MAP6 ve STX1A proteinleri iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlarla karşılaştırıldığında daha fazla ifade edilmektedir. SRR proteinin ise yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara göre daha az ifade edilmektedir. IPA programında GNAQ, GRIA2, MAP6 ve STX1A proteinlerinin artması uzun süreli potansiyel artışını aktive ettiği gösterilmiştir, GRIA2 ise uzun süreli potansiyel artışını başlatmaktadır (Şekil 6.7.11.). DBNL proteininin azalması, GNAQ, MYO5A, PARK7, GRIA2, GNG7, SOD1, HSPA8 ve NGEF proteinlerinin artması IPA tarafından hareket bozukluklarının engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu protein grubu arasında DBNL proteininin yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç

hayvanlara göre daha az ifade edildiği görülmüştür. Bu mekanizmayla ilişkilendirilmiş diğer 8 protein ise yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlarla karşılaştırıldığında daha fazla ifade edilmektedir (Şekil 6.7.12.). İfadesinin artması IPA tarafından koordinasyonun artması ile ilişkilendirilmiş PPP2R5D, DBNL, GNAQ, GRIA2 ve PARK7 proteinlerinden PPP2R5D ve DBNL proteinlerinin yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç hayvanlara göre daha az ifade edildiği görülmüştür. GNAQ, GRIA2 ve PARK7 proteinleri ise iskemi ile beyin felci indüklenmiş yaşlı hayvanların iskemik striatumlarında genç farelere kıyasla daha fazla ifade edilmektedir (Şekil 6.7.13.).

Tanımlanan proteinlerin büyük bir kısmının iskemi prognozunda etkili yollarla ilişkilendirildiği görülmüştür. Her bir proteinin ifadesinin yaşlı ve genç hayvanlar arasında gözlenen değişimi ayrı bir çalışma konusudur. İskemi geçirmiş yaşlı hayvanların striatumunda ifadesi genç hayvanlara göre daha fazla olmasıyla SOD1, MYO5A, GRIA2 ve PARK7 proteinleri dikkat çekmiştir. Fizyolojik koşullarda SOD1 proteinin ROT'lara karşı antioksidan görevi gördüğü bilinmektedir (96). Davis ve arkadaşları tarafından serebral iskemi geçiren hayvanların striatum bölgesine SOD1 geni eksprese eden virüs enjeksiyonunun, striatal nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (97). Bu sonuç nöronal sağkalım sonucuyla ilişkilidir. Protein analizinde SOD1 proteinin daha fazla ifade edildiği yaşlı hayvanlarda nöronal sağkalımın da genç hayvanlara göre daha fazla olduğu görülmüştür. MYO5A veziküler taşıma proteindir ve organellerin taşınmasından sorumludur (98). Ayrıca yapılan bir çalışmada MYO5A proteinin melanom hücrelerinin apoptotik ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (99). MYO5A proteininin, yapılan protein analizlerinde gençlere kıyasla yaşlı hayvanlarda daha fazla ifade edildiği görülmüştür. DNA fragmentasyonu analiziyle elde edilen apoptotik hücre sayısı MYO5A proteininin ifade edildiği yaşlılarda gençlere göre daha yüksektir. GRIA2 bir glutamat reseptörüdür ve Ca^{+2} iyonlarının geçişini düzenlemektedir. İskemi sonrasında sinaptik boşluklarda artan glutamat bu tür reseptörleri aktive ederek hücre içerisine aşırı Ca^{+2} girmesine neden olmaktadır. Ca^{+2} apoptotik ve nekrotik ölüm yollarını aktifleştirmektedir (100). PARK7 son zamanlarda yapılan çalışmalarda oksidatif stres sensörü olarak görülmektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada astrositik PARK7 proteinin fokal serebral iskemi

kaynaklı oksidatif stresin etkisini azalttığı, serbest radikallere karşı hücreleri koruduğu ve nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (101).

Yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında, iskemik beyin felci indüklenen farelerde yaşa bağlı olarak farklı patolojik yanıtlar geliştiği görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde yaşlı ve genç deney hayvanlarında iskemi sonrası görülen farklı hasar alanı, apoptotik hücre ölümü ve nöronal sağkalım verilerini desteklemektedir. Bu yanıtlara ek olarak moleküler düzeyde, farklı yaş gruplarında protein profilleri de farklılık göstermektedir. Proteom analizi sonucu gözlenen bu farklılıklar hem yaşlanma süreci hem de yaşlılarda iskemi sonrası ortaya çıkan patofizyolojik olayların anlaşılmasında öne çıkmaktadır. Yaşlı ve genç gruplarında anlamlı olarak farklı ifade edilen 100'den fazla proteinin ve bu proteinlerin oluşturdukları moleküler sinyal yollarının ileride tasarlanacak tedaviler için hedef molekül geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, beyinde yaşlanmayla seviyesi artan proteinlerin belirlenmesi, bu proteinlerin bilinmeyen fonksiyonları olabileceğine işaret etmekte ve gelecekte bu mekanizmaların açığa çıkarılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Yaşlanma sürecinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte yaşlılarda daha çok görülen iskemik beyin felci ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde rol alan mekanizmalar düzenlenecek daha kapsamlı çalışmalarla ortaya konabilecektir.

8. KAYNAKLAR

1. Field, TS, and Benavente, OR. Current status of antiplatelet agents to prevent stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11, 6-14. (2011).
2. Writing Group, M, Mozaffarian, D, Benjamin, EJ, Go, AS, Arnett, DK, Blaha, MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 133, e38-360. (2016).
3. Takeuchi, N, and Izumi, S. Rehabilitation with poststroke motor recovery: a review with a focus on neural plasticity. *Stroke Res Treat* 2013, 128641. (2013).
4. Mauldin, PD, Simpson, KN, Palesch, YY, Spilker, JS, Hill, MD, Khatri, P, et al. Design of the economic evaluation for the Interventional Management of Stroke (III) trial. *Int J Stroke* 3, 138-144. (2008).
5. Gravanis, I, and Tsirka, SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 12, 159-170. (2008).
6. Chen, RL, Balami, JS, Esiri, MM, Chen, LK, and Buchan, AM. Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nat Rev Neurol* 6, 256-265. (2010).
7. Hankey, GJ. Stroke. *Lancet* 389, 641-654. (2017).
8. Deb, P, Sharma, S, and Hassan, KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 17, 197-218. (2010).
9. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397. (1999).
10. Grewer, C, Gameiro, A, Zhang, Z, Tao, Z, Braams, S, and Rauen, T. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 60, 609-619. (2008).
11. Traynelis, SF, Wollmuth, LP, McBain, CJ, Menniti, FS, Vance, KM, Ogden, KK, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496. (2010).
12. Lee, JM, Grabb, MC, Zipfel, GJ, and Choi, DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106, 723-731. (2000).
13. Sattler, R, and Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78, 3-13. (2000).

14. Caldeira, MV, Salazar, IL, Curcio, M, Canzoniero, LM, and Duarte, CB. Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: friend or foe? *Prog Neurobiol* 112, 50-69. (2014).
15. Khan, M, Dhammu, TS, Matsuda, F, Annamalai, B, Dhindsa, TS, Singh, I, et al. Targeting the nNOS/peroxynitrite/calpain system to confer neuroprotection and aid functional recovery in a mouse model of TBI. *Brain Res* 1630, 159-170. (2016).
16. Starkov, AA, Chinopoulos, C, and Fiskum, G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 36, 257-264. (2004).
17. Paschen, W, and Doutheil, J. Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1-18. (1999).
18. Berridge, MJ, Lipp, P, and Bootman, MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21. (2000).
19. Kaufman, RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233. (1999).
20. Lai, E, Teodoro, T, and Volchuk, A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22, 193-201. (2007).
21. Nikolettou, V, Markaki, M, Palikaras, K, and Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3448-3459. (2013).
22. Jin, R, Liu, L, Zhang, S, Nanda, A, and Li, G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res* 6, 834-851. (2013).
23. Iadecola, C, and Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796-808. (2011).
24. Denes, A, Vidyasagar, R, Feng, J, Narvainen, J, McColl, BW, Kauppinen, RA, et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1941-1953. (2007).
25. Dreier, JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17, 439-447. (2011).

26. Ayata, C, and Lauritzen, M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev* 95, 953-993. (2015).
27. Segura, T, Calleja, S, and Jordan, J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin Pharmacother* 9, 1071-1085. (2008).
28. National Institute of Neurological, D, and Stroke rt, PASSG. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333, 1581-1587. (1995).
29. Hacke, W, Kaste, M, Bluhmki, E, Brozman, M, Davalos, A, Guidetti, D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317-1329. (2008).
30. Kikuchi, K, Miura, N, Kawahara, KI, Murai, Y, Morioka, M, Lapchak, PA, et al. Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, is a potentially useful addition to thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke. *Biomed Rep* 1, 7-12. (2013).
31. Ding, Z, Tong, WC, Lu, XX, and Peng, HP. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: a review. *Interv Neurol* 2, 201-211. (2014).
32. Qi, Z, Liu, W, Luo, Y, Ji, X, and Liu, KJ. Normobaric hyperoxia-based neuroprotective therapies in ischemic stroke. *Med Gas Res* 3, 2. (2013).
33. Lee, JH, Wei, ZZ, Cao, W, Won, S, Gu, X, Winter, M, et al. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol Dis* 96, 248-260. (2016).
34. James, MFL, M.W. . Making Progress in the Acute Treatment of Stroke. *International Journal of Pharmaceutical Medicine* 19, 77-88. (2006).
35. O'Collins, VE, Macleod, MR, Donnan, GA, Horky, LL, van der Worp, BH, and Howells, DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Annals of neurology* 59, 467-477. (2006).
36. Gladstone, DJ, Black, SE, Hakim, AM, Heart, and Stroke Foundation of Ontario Centre of Excellence in Stroke, R. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 33, 2123-2136. (2002).

37. Biesalski, HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 5-10. (2002).
38. Medvedev, ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65, 375-398. (1990).
39. Tosato, M, Zamboni, V, Ferrini, A, and Cesari, M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging* 2, 401-412. (2007).
40. Gavrilov, LA, and Gavrilova, NS. Evolutionary theories of aging and longevity. *ScientificWorldJournal* 2, 339-356. (2002).
41. Gladyshev, VN. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid Redox Signal* 20, 727-731. (2014).
42. Weinert, BT, and Timiras, PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985) 95, 1706-1716. (2003).
43. Jin, K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis* 1, 72-74. (2010).
44. Xia, S, Zhang, X, Zheng, S, Khanabdali, R, Kalionis, B, Wu, J, et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016, 8426874. (2016).
45. Franceschi, C, Valensin, S, Bonafe, M, Paolisso, G, Yashin, AI, Monti, D, et al. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35, 879-896. (2000).
46. Kirkwood, TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447. (2005).
47. Lord, CJ, and Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287-294. (2012).
48. Blackburn, EH, Greider, CW, and Szostak, JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12, 1133-1138. (2006).
49. Han, S, and Brunet, A. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol* 22, 42-49. (2012).
50. Kaushik, S, and Cuervo, AM. Proteostasis and aging. *Nat Med* 21, 1406-1415. (2015).
51. Lopez-Otin, C, Blasco, MA, Partridge, L, Serrano, M, and Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217. (2013).

52. Mc Auley, MT, Guimera, AM, Hodgson, D, McDonald, N, Mooney, KM, Morgan, AE, et al. Modelling the molecular mechanisms of aging. *Biosci Rep* 37(2017).
53. Youssef, SA, Capucchio, MT, Rofina, JE, Chambers, JK, Uchida, K, Nakayama, H, et al. Pathology of the Aging Brain in Domestic and Laboratory Animals, and Animal Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Vet Pathol* 53, 327-348. (2016).
54. Peters, A. Structural changes that occur during normal aging of primate cerebral hemispheres. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 733-741. (2002).
55. Petralia, RS, Mattson, MP, and Yao, PJ. Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure. *Ageing Res Rev* 14, 31-42. (2014).
56. Satoh, A, Imai, SI, and Guarente, L. The brain, sirtuins, and ageing. *Nat Rev Neurosci* 18, 362-374. (2017).
57. Drayer, BP. Imaging of the aging brain. Part I. Normal findings. *Radiology* 166, 785-796. (1988).
58. Giorgio, A, Santelli, L, Tomassini, V, Bosnell, R, Smith, S, De Stefano, N, et al. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage* 51, 943-951. (2010).
59. Oakley, R, and Tharakan, B. Vascular hyperpermeability and aging. *Aging Dis* 5, 114-125. (2014).
60. Niccoli, T, and Partridge, L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22, R741-752. (2012).
61. Poisson, SN, Glidden, D, Johnston, SC, and Fullerton, HJ. Deaths from stroke in US young adults, 1989-2009. *Neurology* 83, 2110-2115. (2014).
62. Rothwell, PM, Coull, AJ, Silver, LE, Fairhead, JF, Giles, MF, Lovelock, CE, et al. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 366, 1773-1783. (2005).
63. Kammergaard, LP, Jorgensen, HS, Reith, J, Nakayama, H, Pedersen, PM, Olsen, TS, et al. Short- and long-term prognosis for very old stroke patients. The Copenhagen Stroke Study. *Age Ageing* 33, 149-154. (2004).

64. Marini, C, Baldassarre, M, Russo, T, De Santis, F, Sacco, S, Ciancarelli, I, et al. Burden of first-ever ischemic stroke in the oldest old: evidence from a population-based study. *Neurology* 62, 77-81. (2004).
65. Maaijwee, NA, Rutten-Jacobs, LC, Schaapsmeeders, P, van Dijk, EJ, and de Leeuw, FE. Ischaemic stroke in young adults: risk factors and long-term consequences. *Nat Rev Neurol* 10, 315-325. (2014).
66. Popa-Wagner, A, Badan, I, Walker, L, Groppa, S, Patrana, N, and Kessler, C. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol* 113, 277-293. (2007).
67. Moraga, A, Pradillo, JM, Garcia-Culebras, A, Palma-Tortosa, S, Ballesteros, I, Hernandez-Jimenez, M, et al. Aging increases microglial proliferation, delays cell migration, and decreases cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 12, 87. (2015).
68. Badan, I, Buchhold, B, Hamm, A, Gratz, M, Walker, LC, Platt, D, et al. Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 845-854. (2003).
69. Zhao, SC, Wang, C, Xu, H, Wu, WQ, Chu, ZH, Ma, LS, et al. Age-related differences in interferon regulatory factor-4 and -5 signaling in ischemic brains of mice. *Acta Pharmacol Sin* 38, 1425-1434. (2017).
70. Tang, Y, Wang, L, Wang, J, Lin, X, Wang, Y, Jin, K, et al. Ischemia-induced Angiogenesis is Attenuated in Aged Rats. *Aging Dis* 7, 326-335. (2016).
71. Darsalia, V, Heldmann, U, Lindvall, O, and Kokaia, Z. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 36, 1790-1795. (2005).
72. Tan, YF, Preston, E, and Wojtowicz, JM. Enhanced post-ischemic neurogenesis in aging rats. *Front Neurosci* 4(2010).
73. Ovbiagele, B, and Nguyen-Huynh, MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics* 8, 319-329. (2011).
74. Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, AB, Turkseven, S, Gurel, B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* (2017).

75. Caglayan, B, Caglayan, AB, Beker, MC, Yalcin, E, Beker, M, Kelestemur, T, et al. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 296, 23-31. (2017).
76. Beker, MC, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* 6, 30604-30614. (2015).
77. Wisniewski, JR, Zougman, A, Nagaraj, N, and Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359-362. (2009).
78. Hacariz, O, Baykal, AT, Akgun, M, Kavak, P, Sagiroglu, MS, and Sayers, GP. Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics* 14, 1519-1530. (2014).
79. Serhatli, M, Baysal, K, Acilan, C, Tuncer, E, Bekpinar, S, and Baykal, AT. Proteomic study of the microdissected aortic media in human thoracic aortic aneurysms. *J Proteome Res* 13, 5071-5080. (2014).
80. Acioglu, C, Mirabelli, E, Baykal, AT, Ni, L, Ratnayake, A, Heary, RF, et al. Toll like receptor 9 antagonism modulates spinal cord neuronal function and survival: Direct versus astrocyte-mediated mechanisms. *Brain Behav Immun* 56, 310-324. (2016).
81. Chamorro, A, Dirnagl, U, Urra, X, and Planas, AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol* 15, 869-881. (2016).
82. Moskowitz, MA, Lo, EH, and Iadecola, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181-198. (2010).
83. Landis, SC, Amara, SG, Asadullah, K, Austin, CP, Blumenstein, R, Bradley, EW, et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature* 490, 187-191. (2012).
84. Lapchak, PA, Zhang, JH, and Noble-Haeusslein, LJ. RIGOR guidelines: escalating STAIR and STEPS for effective translational research. *Transl Stroke Res* 4, 279-285. (2013).
85. Liu, F, Yuan, R, Benashski, SE, and McCullough, LD. Changes in experimental stroke outcome across the life span. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 792-802. (2009).

86. Rousselet, E, Kriz, J, and Seidah, NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp* (2012).
87. Rosen, CL, Dinapoli, VA, Nagamine, T, and Crocco, T. Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia. *J Neurosurg* 103, 687-694. (2005).
88. Sutherland, GR, Dix, GA, and Auer, RN. Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke* 27, 1663-1667; discussion 1668. (1996).
89. Li, S, Zheng, J, and Carmichael, ST. Increased oxidative protein and DNA damage but decreased stress response in the aged brain following experimental stroke. *Neurobiol Dis* 18, 432-440. (2005).
90. Popa-Wagner, A, Schroder, E, Walker, LC, and Kessler, C. beta-Amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. *Stroke* 29, 2196-2202. (1998).
91. Wang, RY, Wang, PS, and Yang, YR. Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology* 49, 27-32. (2003).
92. Dore, S, Otsuka, T, Mito, T, Sugo, N, Hand, T, Wu, L, et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Annals of neurology* 54, 155-162. (2003).
93. Broughton, BR, Reutens, DC, and Sobey, CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-339. (2009).
94. Anuncibay-Soto, B, Perez-Rodriguez, D, Llorente, IL, Regueiro-Purrinos, M, Gonzalo-Orden, JM, and Fernandez-Lopez, A. Age-dependent modifications in vascular adhesion molecules and apoptosis after 48-h reperfusion in a rat global cerebral ischemia model. *Age (Dordr)* 36, 9703. (2014).
95. Lavezzi, AM, Corna, MF, and Matturri, L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *J Neurol Sci* 329, 45-50. (2013).
96. Sugawara, T, and Chan, PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 5, 597-607. (2003).
97. Davis, AS, Zhao, H, Sun, GH, Sapolsky, RM, and Steinberg, GK. Gene therapy using SOD1 protects striatal neurons from experimental stroke. *Neurosci Lett* 411, 32-36. (2007).

98. Mehta, AD, Rock, RS, Rief, M, Spudich, JA, Mooseker, MS, and Cheney, RE. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400, 590-593. (1999).
99. Izidoro-Toledo, TC, Borges, AC, Araujo, DD, Mazzi, DP, Nascimento Junior, FO, Sousa, JF, et al. A myosin-Va tail fragment sequesters dynein light chains leading to apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Dis* 4, e547. (2013).
100. Weilingner, NL, Maslieieva, V, Bialecki, J, Sridharan, SS, Tang, PL, and Thompson, RJ. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacol Sin* 34, 39-48. (2013).
101. Yanagida, T, Tsushima, J, Kitamura, Y, Yanagisawa, D, Takata, K, Shibaike, T, et al. Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxid Med Cell Longev* 2, 36-42. (2009).

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
08/06/2017	33		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Yaşlı ve Genç Farelerin Beyin Felci Sonrası Protein Ekspresyon Profili” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aysun	Soyadı	DİLDEN
Doğum Yeri	Antalya	Doğum Tarihi	26.01.1989
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail	aysundilden@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2012
Lise	H.M.M. Bileydi Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.			
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	81,25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,80	73,51	66,66
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaaları/Ödüülleri/Diğer

Uluslararası Bildiriler

1. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, **Dilden A**, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Sarma M, Kilic E, “The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. Poster- Yalcin E, Caglayan AB, Beker MC, Gurel B, Kelestemur T, Caglayan B, Dalay A, **Dilden A**, Altunay S, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, “Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

Ulusal Bildiler ve Sözlü Sunumlar

1. Sözlü Sunum- **Dilden A**, Yalçın E, Sertel E, Türkseven Ş, Balçıkınlı Z, Altunay S, Dalay A, Yuluğ B, Kılıç E, “Oatp1a5’in Beyin Felci Sonrası Doku İlaç Birikimi ve Hasarı Üzerine Olan Etkileri” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, SS17/41 ,Denizli, 2017.
2. Poster- Altunay S, Dalay A, **Dilden A**, Sertel E, Balçıkınlı Z, Tancan E, Karaçay R, Kılıç E, “Diyet Kısıtlaması Sonrası Önkoşullandırmanın Fare Beyin Felci Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkileri” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS074/94, Denizli, 2017.
3. Sözlü Poster- Beker MC, Sertel E, Karaçay R, Altunay S, **Dilden A**, Çağlayan AB, Keleştemur T, Çağlayan B, Yalçın E, Kılıç E, “Sirkadyen Ritim Proteini BMAL 1’in Nöronal Hasar Üzerine Etkisi” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS043/79, Denizli, 2017.
4. Sözlü Poster- Keleştemur T, Beker MÇ, Çağlayan AB, Çağlayan B, Dalay A, Altunay S, Yalçın E, Sertel E, **Dilden A**, Kılıç E, “Yenidoğan Hipoksisinde Normobarik Oksijen Tedavisinin ve Melatoninin Plastisite Üzerine Etkisi” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS041/78, Denizli, 2017.

5. Sözlü Poster- Çağlayan AB, Yalçın E, Altunay S, Sertel E, **Dilden A**, Karaçay R, Beker MC, Keleştemur T, Çağlayan B, Kutlu S, Kılıç Ü, Kılıç E, “Tekrarlayan Transkraniyal Manyetik Stimulasyonun Beyin Felci Sonrası Hasara Etkisi” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS045/80, Denizli, 2017.
6. Sözlü Sunum- Keleştemur T, Beker MC, Çağlayan AB, Yalçın E, Altunay S, Dalay A, Sertel E, **Dilden A**, Çağlayan B, Kilic E, “Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia” Turkish Society of Physiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/ Turkey, 2016.
7. Poster- Yalçın E, Çağlayan AB, Beker MC, Keleştemur T, Çağlayan B, Altunay S, Dalay A, **Dilden A**, Sertel E, Kilic E, “The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy” Turkish Society of Physiological Sciences 42nd National Physiology Congress , PC108, Düzce/Turkey, 2016.
8. Poster- Çağlayan AB, Beker MC, Çağlayan B, Altunay S, Dalay A, **Dilden A**, Sertel E, Keleştemur T, Yalçın E, Kilic U, Saarma M, Kilic E, “Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia” Turkish Society of Physiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016

Sertifikalar

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
2. Uygulamalı Proteomik Eğitimi Sertifikası