



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**REV-ERB α VE REV-ERB β 'NİN AKUT BEYİN HASARI
SONRASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

SERDAR ALTUNAY

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Serdar ALTUNAY
Tez Başlığı : Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin akut beyin hasarı sonrası rolünün incelenmesi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi

Sınav Tarihi : 27.12.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar BEKER

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Birsen ELİBOL

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç.Dr. Ayşegül DOĞAN

Yeditepe Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SERDAR ALTUNAY

İTHAF



*“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bana rehberlik eden, destekleyen, yeni ufuk ve vizyon katan danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en derin minnettarlığımı sunuyorum.

Her daim desteğini gördüğüm, engin bilgisi, samimiyeti ve yapıcı fikirleriyle bana vizyon katan Dr. Öğr. Üye. Mustafa Çağlar BEKER'e en derin minnettarlığımı sunarım. Laboratuvarında desteğini esirgemeyen, değerli bilgisini ve yardımını her daim paylaşan, Dr. Öğr. Üye. Berrak ÇAĞLAYAN'a en derin minnettarlığımı sunarım. Ayrıca yüksek öğrenimimde bana deneyimlerini, bilgilerini aktaran ve el becerilerimin gelişmesinde katkıda bulunan Dr. Öğr. Üye. Ahmet Burak ÇAĞLAYAN ve Dr. Öğr. Üye. Taha KELEŞTEMUR'a en derin minnettarlığımı sunarım.

SABİTA altyapısını kuran, bizlere efektif ve kaliteli cihazlar ile çalışma imkanı sağlayan değerli müdürümüz Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar içerisinde birçok zorluğun üstünden birlikte geldiğimiz değerli Mehmet Özgen ALTINTAŞ'a, İrem ÇULHA TAŞKIN'a, Zeynep BALÇIKANLI'ya, Saltuk Buğra BALTACI'ya, Halil İbrahim KOÇ'a, Sevban BAYIRLI'ya, Ayşenur ÖZPINAR'a, Buse BALABAN'a, Çiğdem BAYRAKTAROĞLU'na, Zehra DEĞİRMENCİ'ye, Oğuzhan BAYGÜL'e ve dostum Semih DURMUŞ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli MEDİTAM ekibine; Ekrem M. ÖZDEMİR, Ali ŞENBAHÇE, Barış CEBECİ ve Caner BAL'a teşekkür ederim.

Son olarak bana verdikleri bitmek bilmeyen sevgi, destek ve anlayış için canım annem Birgül ALTUNAY, babam Mehmet ALTUNAY ve kardeşim İrem ALTUNAY'a en derin minnettarlığımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Serebral İskeminin Patofizyolojisi	5
4.1.1. Yayılan depolarizasyon	8
4.1.2. Eksitotoksisite	9
4.1.3. Oksidatif stres.....	13
4.1.4. İnflamasyon	16
4.2. Terapi yöntemleri	21
4.3. Sirkadiyen Ritim	23
4.4. Sirkadiyen Ritim ve Serebral İskemi	26
4.5. Rev-Erb α ve Rev-Erb β	29
5. MATERYAL METOT	32
5.1. Deney Planı ve Deney Grupları	32
5.2. Moleküler Klonlama Çalışmaları.....	34
5.2.1. Rev-Erb α (Nr1d1) ve Rev-Erb β (Nr1d2) primer dizaynı.....	36
5.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu vasıtasıyla Nr1d1 ve Nr1d2 genlerinin çoğaltılması	39
5.2.3. ShRev Erb- α ve ShRev Erb- β inhibisyon plasmidlerinin klonlanması.....	41
5.2.4. Nr1d1 ve Nr1d2 genleri için agaroz jelden DNA izolasyonu	42

5.2.5. Nr1d1 ve Nr1d2 genlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	43
5.2.6. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünlerini saflaştırma ve konsantre hale getirme işlemi	43
5.2.7. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünleri için ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi	44
5.2.8. Transformasyon işlemi için kompetent bakteri hazırlanması.....	45
5.2.9. Ligasyon ürünlerinin kompetent bakterilere transformasyonlarının gerçekleştirilmesi	45
5.2.10. Transformasyon sonrası doğrulama için koloni PCR yapılması	46
5.2.11. Transformasyon yapılan kolonilerin düşük miktarda çoğaltılması	47
5.2.12. Üretilen Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi.....	48
5.2.13. Kontrolü yapılan Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin kompetent bakterilere transformasyonu ve yüksek miktarda üretilmesi.....	50
5.2.14. Yüksek miktarda lentivirüs üretimi.....	51
5.3. Deney Hayvanı Çalışmaları	53
5.3.1. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi.....	53
5.3.2. Serebral iskemi modelinin uygulanması	54
5.3.3. Nörolojik skorlama.....	56
5.4. Cryostat Cihazı Kullanılarak Beyinlerin Kesilmesi.....	57
5.5. Enfarktüs Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi.....	57
5.6. Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi.....	57
5.7. Proteomik Analizler	58
5.8. İstatistiksel Analizler.....	58
6. BULGULAR.....	59
6.1. Lentivirüslerle Hücrelerin Enfekte Edilmesi.....	59
6.2. Laser Doppler Akışmetre	63
6.3. Nörolojik Skorlama	64
6.4. Hasar Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi.....	66
6.5. Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi.....	69
6.6. Proteomik Analizler	71
7. TARTIŞMA	83
8. SONUÇ.....	90
9. KAYNAKLAR	91

10. ETİK KURUL ONAYI.....	115
11. ÖZGEÇMİŞ.....	116



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
DAMP	Hasar ilişkili moleküler patern
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	Ekstraselular sinyal-düzenleyici kinaz
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon düzenleyici faktör
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KBB	Kan beyin bariyeri
LDF	Laser Doppler akışmetre
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MCAO	Orta serebral arter oklüzyonu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
Nrf2-Are	NF-E2-ilişkili faktör 2- Antioksidan duyarlı element
RORα	Retinoik asit reseptör ilişkili orfan reseptör alfa
ROS	Serbest oksijen radikalleri
SD	Yayılan depolarizasyon
TLR	Toll benzeri reseptör
ZT	Zeitgeber zamanı

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.2.2.1. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için polimeraz zincir reaksiyonu hesaplamaları.	39
Tablo 5.2.2.2. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için polimeraz zincir reaksiyonu termal döngüsü.....	40
Tablo 5.2.5.1. Nr1d1 ve Nr1d2 genleri ile p-lenti EF1 α vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim hesaplamaları.....	43
Tablo 5.2.10.1. Koloni PCR hesaplaması.....	46
Tablo 5.2.12.1. EF1 α plazmidi için restriksiyon enzimleriyle kesim hesaplamaları..	49
Tablo 5.2.12.2. Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidleri için restriksiyon enzimleriyle kesim hesaplamaları.....	49
Tablo 5.2.14.1. Lentivirüs üretimi için gerekli olan moleküllerin miktarları.....	52
Tablo 5.2.14.2. "A" solüsyonunun hazırlanması.....	52
Tablo 5.2.14.3. p-Lenti Ef1 α ve klonlanan plazmidler için "B" solüsyonlarının hazırlanması.....	53
Tablo 6.6.1. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-1.....	72
Tablo 6.6.2. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-2.....	73
Tablo 6.6.3. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-3.....	74
Tablo 6.6.4. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-4.....	75
Tablo 6.6.5. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-5.....	76
Tablo 6.6.6. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-6.....	77
Tablo 6.6.7. Protein anlatımı artırılan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-7.....	78

Tablo 6.6.8. Protein anlatımı artırılan RevErb α / β 'nin proteom tablosu-8..... 79

Tablo 6.6.9. Protein anlatımı baskılanan RevErb α / β 'nin proteom tablosu-1 81

Tablo 6.6.10. Protein anlatımı baskılanan RevErb α / β 'nin proteom tablosu-2 82



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. İskemi patofizyolojisi..	7
Şekil 4.3.1. Sirkadiyen ritim döngüsü.....	25
Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.	34
Şekil 5.2.1. Lenti-EF-1 α -GFP-2A-Puro vektörü, ABM.	35
Şekil 5.2.2. pLVTHM vektörü, Addgene.	35
Şekil 5.2.1.1. Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (Nr1d1), mRNA; NCBI Referans numarası: NM_021724.5.	36
Şekil 5.2.1.2. Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2), transcript variant 1, mRNA; NCBI Referans numarası: NM_005126.5.	38
Şekil 5.2.2.1. Nr1d1 geninin PCR reaksiyonu sonrası jel görüntüsü.....	41
Şekil 5.2.2.2. Nr1d2 geninin PCR reaksiyonu sonrası jel görüntüsü.....	41
Şekil 5.2.7.1. Nr1d1 için ligasyon hesaplaması.	44
Şekil 5.2.7.2. Nr1d2 için ligasyon hesaplaması.	45
Şekil 5.2.10.1. Koloni PCR sonrası Nr1d1 plazmidi için jel görüntüsü.	47
Şekil 5.2.10.2. Koloni PCR sonrası Nr1d2 plazmidi için jel görüntüsü.	47
Şekil 5.2.12.1. Nr1d1 (A) ve Nr1d2 (B) için restriksiyon enzimleriyle doğrulama aşamasındaki jel görüntüleri.	50
Şekil 5.3.1.1. Beyin içi enjeksiyon düzeneği.	54
Şekil 5.3.2.1. Fiber optik kablonun takılması (A) ve MCAO operasyonunun gerçekleştirilmesi (B).	56
Şekil 5.4.1. Beyinden alınan koronal kesitlerin bölgeleri.	57

Şekil 6.1.1. Lentivirüs enfeksiyon verimliliği.	59
Şekil 6.1.2. Lv-Rev Erb- α plazmidinin Rev-Erb- α protein seviyesi üzerine etkisi. ..	60
Şekil 6.1.3. Lv-Rev Erb- β plazmidinin Rev-Erb- β protein seviyesi üzerine etkisi. ..	60
Şekil 6.1.4. Rev-Erb α inhibisyon plazmidlerinin Rev-Erb α protein seviyesi üzerine etkisi.	61
Şekil 6.1.5. Rev-Erb β inhibisyon plazmidlerinin Rev-Erb β protein seviyesi üzerine etkisi.	62
Şekil 6.2.1. Laser Doppler akışmetre.	63
Şekil 6.3.1. Nörolojik skorlama testi.	65
Şekil 6.4.1. Beyin hasar hacmi analizi.	67
Şekil 6.4.2. Beyin ödem analizi.	68
Şekil 6.5.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin analizi.	70
Şekil 6.6.1. RevErb α/β protein ifadesi artırılmış grubun yolak analizi.	79
Şekil 6.6.2. RevErb α/β protein ifadesi baskılanmış grubun yolak analizi.	82

1. ÖZET

REV-ERB α VE REV-ERB β 'NİN AKUT BEYİN HASARI SONRASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Dünyada ölüm nedenleri bakımından ikinci sırada yer alan inmenin insidansı sirkadiyen bir dağılım göstermektedir. Tüm fizyolojik durumlarımızı düzenleyen sirkadiyen ritmin hem inmenin tetiklenmesine hem de inme sonrasında gelişen patofizyolojik süreçlere önemli etkileri bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde ve devam ettirilmesinde görevli olduğu bilinen nükleer reseptörler RevErb α ve RevErb β 'nin (RevErb α/β) patofizyolojik süreçlerde önemli rollerinin olabileceğini göstermektedir. Bu tez kapsamında nükleer reseptörler olan RevErb α/β 'nin (lentivirüs aracılığı ile) protein ifadelerinin artırılmasının veya baskılanmasının fare akut iskemi modelindeki etkileri araştırılmıştır. Beyin hasarı sonrası elde edilen beyin dokularından enfarktüs hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliği araştırılmıştır. Ayrıca geniş ölçekli sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi aracılı proteomik analizlerle RevErb α/β 'nin etkilediği protein profili gösterilmiştir. Protein ifadesi artırılan grupta hasar hacmi, ödem hacmi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin azaldığı görülmüştür. Tersine, protein ifadesi baskılanan grupta ise, hasar hacmi, ödem hacmi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan proteom analizinde RevErb α/β protein ifadesi artırılan gruplarda 291, baskılanan gruplarda ise 50 farklı proteinin anlatımının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değiştiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, RevErb α/β protein ifadelerinin artırılması veya baskılanmasının iskemik inmenin patofizyolojisi üzerine farklı etkileri olduğunu göstermektedir.

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 1001 proje kapsamında 219S913 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut iskemi, RevErb α , RevErb β , Sirkadiyen ritim

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF REV-ERB α AND REV-ERB β AFTER ACUTE BRAIN INJURY

The incidence of stroke, which ranks second in the world in terms of causes of death, shows a circadian distribution. The circadian rhythm, that regulates all our physiological states, has important effects on both the triggering of stroke and the pathophysiological processes that develop after stroke. Recent studies have shown that the nuclear receptors RevErb α and RevErb β (RevErb α/β), which are known to be involved in the regulation and maintenance of circadian rhythm, may have important roles in pathophysiological processes of stroke. Within the scope of this thesis, the effects of increasing or suppressing the protein expressions of the nuclear receptors RevErb α/β (lentivirus-mediated) in the mouse acute ischemia model were investigated. Infarction volume, cerebral edema and blood brain barrier permeability were investigated from brain tissues obtained from mice after sacrifice. In addition, large-scale liquid chromatography/mass spectrometry-mediated proteomic analyses have shown the protein profile affected by RevErb α/β . It was observed that the infarct volume, edema volume and blood brain barrier permeability decreased in the group with increased protein expression. Conversely, in the group with suppressed protein expression was observed that the infarct volume, cerebral edema and blood-brain barrier permeability increased. In the proteome analysis, it was shown that the expression of 291 different proteins changed in the groups whose RevErb α/β protein expression was increased, and in the suppressed groups, the expression of 50 different proteins changed. The results obtained show that increasing or suppressing RevErb α/β protein expressions have different effects on the pathophysiology of ischemic stroke.

This thesis was supported by the TUBITAK project No: 219S913 within the scope of the 1001 project.

Keywords: Acute Ischemia, Circadian rhythm, RevErb α , RevErb β

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral iskemi dünya genelinde ölüm nedenleri bakımından incelendiğinde ikinci sırada yer alan ciddi bir nöronal hastalıktır. Serebral iskeminin başlangıcından itibaren ilk 4.5 saat içerisinde uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü (tPA) haricinde bilinen bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır [1, 2]. Dünya genelinde her yıl yaklaşık olarak 5.5-6 milyon insan serebral iskemiyeye maruz kalmaktadır [3, 4]. Görülen her üç beyin felci vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken hayatta kalanlar yaşamlarının geri kalanını ciddi nörolojik eksiklikler ile sürdürmek durumundadır. Serebral iskemi geçirmiş ve tedavi sürecinde olan yaklaşık 80 milyon kişinin sağlık giderleri ve evde bakım maliyetleri göz önüne alındığında ülke ekonomilerine milyarlarca dolarlık yük getirdiği görülmektedir [4-6].

Sağlık, bilim ve teknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde dünya genelinde doğumlarla birlikte, insanların yaşam süresi de her geçen yıl artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization; WHO) ve Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İşler Bölümü'nün (UN DESA) yaptığı araştırmalar 2030 yılında dünya nüfusunun 7.3 milyardan 8.5 milyara ulaşacağı yönündedir. İstatistiksel veriler göz önüne alındığında dünya ile aynı paralellikte ülkemizde de yaşlı nüfusunun giderek artması beklenmektedir. Yaşlı nüfusunun artmasına bağlı olarak özellikle Alzheimer, Parkinson ve serebral iskemi gibi nörolojik hastalıkların görülme sıklığının arttığı ve giderek de artacağı öngörülmektedir. Bu bilgiler dahilinde, özellikle 65 yaş üstü insanlarda daha sık görülen bir hastalık olan serebral iskemi vakalarının da artacağı düşünülmektedir [7-9]. Bu nedenlerden dolayı serebral iskemiyeye yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve yeni hedef moleküllerin bulunması önem arz etmektedir.

Serebral iskemi vakalarının büyük bir kısmı kişi uykudayken meydana gelmekte ve erken müdahale için gerekli zaman aralığı daralmaktadır. Bu durumun meydana gelmesi gece gündüz döngüsünü kapsayan sirkadiyen ritmin serebral iskemi üzerine olan etkilerinin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Sirkadiyen ritme bağlı olarak gün içerisinde değişen kalp ritmi, hormonal değişimler, pıhtılaşma gibi

faktörler serebrovasküler hastalıkların tetiklenmesine neden olmaktadır [10]. Ayrıca yayımlanan bir çalışmada sirkadiyen ritmin beyin felci sonrasında gelişen hasar mekanizmaları üzerine olan etkileri gösterilmiştir [11]. Sirkadiyen ritim, organizmaların iç fizyolojik süreçlerini dış ortamdaki gelen uyarılara bağlı olarak hassas bir şekilde senkronize eden biyolojik bir saattir. Bu biyolojik saat gün içerisindeki aydınlık-karanlık döngüsü, mevsimsel değişiklikler ve beslenme gibi dış uyarılara bağlı olarak kendi ritmini düzenlemektedir [12, 13]. RevErb α/β sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli rolleri olan ve vücuttaki metabolik süreçleri etkileyen nuklear reseptör grubunda bulunan proteinlerdir. Yapılan çalışmalarda RevErb α/β proteinlerinin nöroinflamasyon üzerinde etkilerinin olduğu bulunmuştur [14]. Bu sebeple, Rev-Erb α/β 'nin beyindeki inflamatuvar süreçlerdeki etkileri göz önüne alındığında, akut inme gibi beyinde yüksek seviyede inflamatuvar süreçlere neden olan patofizyolojik bir rahatsızlığa karşı etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu proje kapsamında, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırılmasının veya baskılanmasının akut iskemik hasar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, RevErb α/β 'nin protein ifadesini hem artıran hem de azaltan lentivirüs partikülleri dizayn edilmiş ve bu partiküller C57BL6/J farelere beyin içi enjeksiyon yöntemiyle verildikten 7 gün sonra orta serebral arter oklüzyonu modeli uygulanmıştır. Ardından farelerdeki nörolojik durum, enfarktüs hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin araştırılmasının yanı sıra iskemik beyin dokusundan alınan örnekler ile proteomik analizlerin yapılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Serebral İskeminin Patofizyolojisi

Beyin dokusu fizyolojik faaliyetlerini devam ettirebilmek ve canlılığını sürdürebilmek için yüksek miktarda oksijen ve glukoza ihtiyaç duymaktadır. Serebral iskemi sonucunda beyne giden kan akımının azalmasıyla beyin dokusu oksijen ve glukoz açlığına girerek bir takım hücrel ve moleküler mekanizmaları aktive eder ve bunun sonucunda nöronal ve glial fonksiyonları olumsuz olarak etkiler. Ek olarak vasküler bozukluklara ve inflamasyona neden olmaktadır [2]. Beynin beslenmesinde meydana gelen bu bozukluk sonucu nöronlar transmembran gradiyentlerini koruyamazlar ve bunun sonucunda nöronal sinyalleşme bozulur. Bu sürecin devamında nöronlarda anoksik depolarizasyon meydana gelerek presinaptik uçtan nörotransmitter salınımını tetikler [15]. Eksitator nörotransmitterlerin sinaptik yarıktan temizlenmesi aktif enerji gerektiren bir süreçtir. İskemi sonucu oluşan enerji eksikliği sebebiyle de ekstraselular alanda nörotransmitter konsantrasyonu artar. Glutamatın neden olduğu bu süreç eksitotoksisite olarak adlandırılır (**Şekil 4.1.1.**).

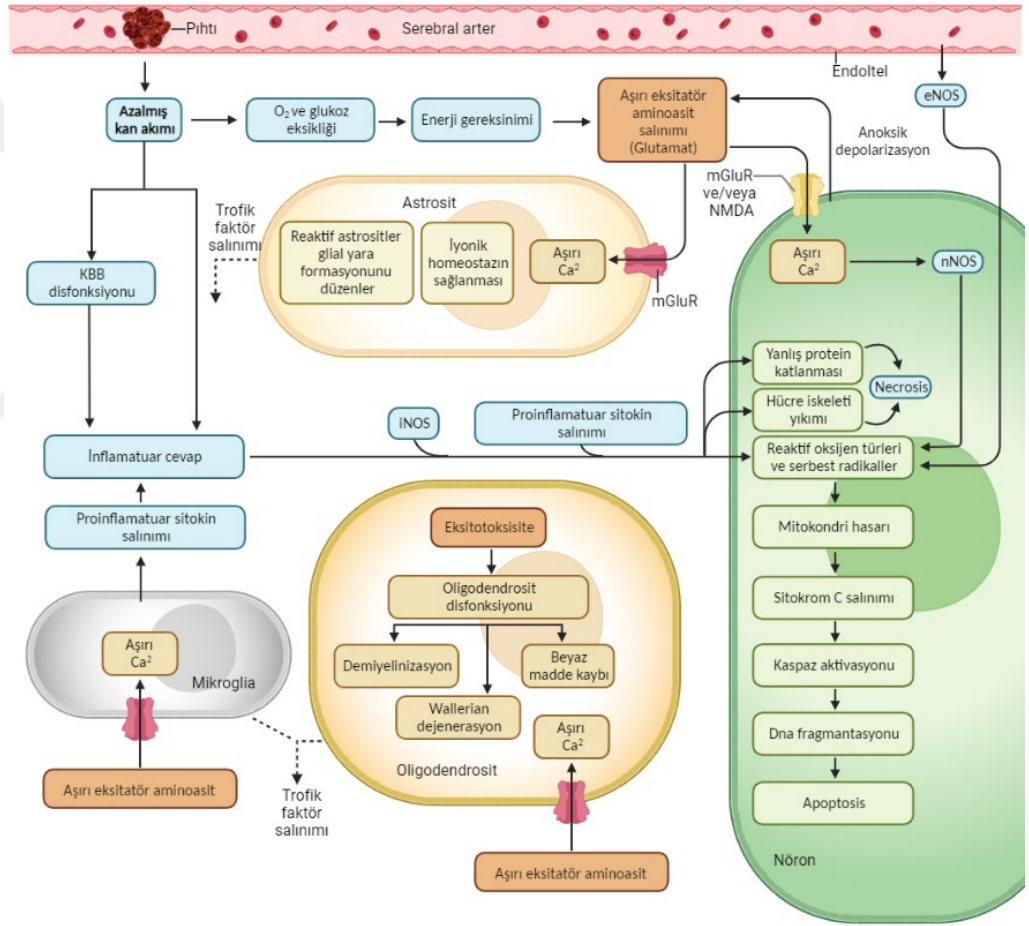
Ek olarak N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü de meydana gelen bu eksitotoksisitenin hücre içinde etkisini göstermesine aracılık eder. Dinlenme membran potansiyelinde kanal tarafı magnezyum ile kapalı olan NMDA reseptörü, membranın depolarize olması ile birlikte magnezyum blokajından kurtulur ve aktif hale gelerek iyon geçirgenliğini artırır [16]. Bunun sonucunda hücre içerisine yüksek miktarda kalsiyum ve sodyum iyonu akışı ile birlikte, intraselular depolardaki kalsiyum serbestlenmesi gerçekleşir [17, 18]. İntraselular kalsiyum konsantrasyonunun artması ile, nöronal nitrik oksit sentaz gibi kalsiyuma bağlı süreçler aktive olmaktadır. Bu sürecin sonunda da serbest radikallerin üretimiyle apoptosis, nekrosis, nekroptosis ve otofaji gibi hücre ölüm mekanizmaları aktive olmaktadır. Serebral iskemi sonucunda, santral sinir sistemi (SSS) boyunca, nöronların yanında, astrositler oligodendrositler ve perisitler de etkilenmektedir. Örneğin, ekstraselular glutamat seviyelerinin artmasıyla metatropik glutamat reseptörü 5'in aktivasyonu, hücre içi kalsiyum seviyelerinin artmasına, glial glutamat

taşıyıcılarının ekspresyonunun azalmasına [19] ve dolayısıyla hücre dışı glutamat seviyelerinin daha fazla artışına yol açar. Ek olarak, astrositler reaktif hale gelerek, koruyucu olan proinflamatuvar (A1) veya zararlı olan immünomodülatör (A2) fenotiplerine dönüşebilmektedir [20, 21]. Reaktif astroglioz, iskemiden 48-96 saat sonra ortaya çıkar ve glial fibriller asidik proteini (bir astrosit belirteci) eksprese eden hücreler hipertrofik hale gelir böylece nöronal rejenerasyonu engelleyen bir glial skar oluşturur [22]. Merkezi sinir sisteminde nöronal aksonlar oligodendrositler tarafından oluşturulan miyelin kılıflarla çevrilidir. Serebral iskemi sonrası oligodendrositlerin durumu her ne kadar astrositler kadar çalışılmasada, iskemik kor bölgesinde oligodendrosit ve oligodendrosit progenitör hücrelerin miktarlarının azaldığı öngörülmektedir [23]. Literatürde hasar çevresinde oligodendrosit progenitor hücrelerin, hasardan 2 hafta sonra remiyelizasyonu artırmak için sayılarının arttığı görülmüştür [24]. Perisitler, kan beyin bariyerinin (KBB) iç tabakasında bulunan ve kontraktıl yeteneğe sahip olan hücrelerdir. İskemiye takiben aktive olan bu hücreler kapillerin kontraksiyonunu sağlamaktadır. Perisitlerin ölümü sonucu irreversibl kapiller kontraksiyonu ve KBB bozulması meydana gelmektedir [25]. Bu bariyerin bozulmasıyla periferel kanda bulunan inflamatuvar hücreler beyin parankimine geçerek hasarı artırmaktadır.

İskemiye takiben, nöronal ubikuitin sistemi bozulur. Bu da daha sonra oksitlenmiş proteinlerin azalmasıyla birlikte, protein agregatlarının oluşumu ve endoplazmik retikulum stresine neden olabilir [26]. Mitokondriyal değişiklikler arasında artmış sisternal kalsiyum seviyeleri, proteaz aktivasyonu, proapoptotik faktörlerin ve serbest radikallerin salınması ve ATP üretiminin azalması yer alır [27].

Kemirgen iskemi modellerinde inflamasyon genellikle yerleşik mikrogliaların erken aktivasyonu, ardından makrofajların ve nötrofil polimorflarının ve lenfositlerin beyin parankimine akması olarak karakterize edilir [28]. İnsanlarda inflamatuvar yanıtla ilgili daha az veri mevcuttur, ancak iskemik kor bölgesinde nötrofil birikiminin, penumbra mikrogliaların aktivasyonu ve proliferasyonu ile iskeminin erken evrelerinde (ilk 3 gün içinde) meydana geldiği öne sürülmüştür. Daha sonra hem beyin kökenli bu mikroglialar hem de kandan türetilen makrofajlar, bir amoeboid fagositik fenotipi benimser ve hücre kalıntıları temizler [29].

Makrofajlar, ağırlıklı olarak proinflamatuvar veya anti-inflamatuvar fenotiplerle kendilerini gösterebilir. İnsanda meydana gelen iskemiyin erken evrelerinde, özellikle peri-enfarktüs bölgelerinde makrofajlar, majör histokompatibilite kompleksi sınıf I moleküllerini (antijen sunumuyla ilgili), NADPH oksidazı (serbest radikal üretimiyle ilgili) ve indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) eksprese ederler [30] (artan fagositoz ile ilişkili fenotip) [31]. Daha sonraki aşamalarda fenotip, azalmış fagositoz ve interferon- γ ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretiminin azalması [31] ile ilişkili mannoz ve haptoglobulin reseptörlerinin (CD206 ve CD163) [30] ekspresyonu ile değişir.



Şekil 4.1.1. İskemi patofizyolojisi. (Ischaemic stroke makelesinden yararlanılarak çizilmiştir [2]).

İskemik inmedeki inflamasyon yanıtı manipüle etmenin terapötik olarak potansiyeli açık değildir. IL-1 reseptör antagonisti ile tedavi hayvan modellerinde koruyucu görünmektedir [32], ancak natalizumab kullanılarak $\alpha 4$ integrin (CD49a) sinyallemesine müdahale etmek gibi diğer yaklaşımların, faz II klinik çalışmasında hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür [33].

4.1.1. Yayılan depolarizasyon

Beyin iskemisinin hemen başlangıcında yayılan depolarizasyon (SD), yüksek beyin bölgelerinin gri maddesinde elektrokimyasal membran yetmezliğinin ve nöronal ödemin ana mekanizmasıdır [34-39]. Şiddetli iskemiden sonraki 1-2 dakika içinde, mevcut ATP havuzunun tükenmesi, Na^+ / K^+ pompasının çalışmasını engelleyerek iskemik doku boyunca ve çevredeki penumbral ve normal dokuya 1-9 mm / dakikada yayılan bir hücrel depolarizasyona sebep olur [40-44]. İskemik kor bölgesinde nöronların, tipik olarak 20-30 dakika veya daha fazla süren bir depolarizasyon altında öldükleri görülmüştür [45-51]. Bununla birlikte, iskemik kor yaklaşık 15 dakika içinde reperfüze edilirse, nöronlar yaklaşık 15 dakika boyunca sürekli depolarize edilmiş olsa dahi iskemik korda bulunan tüm nöronların hayatta kaldığı görülmüştür [48, 52].

Yayılan depolarizasyon sonucu ortaya çıkan akut hasar, SD'nin yayıldığı dokudaki metabolik stres derecesi ile belirlenen bir "süreklilik" olarak karakterize edilmiştir [42, 53]. Bu kavram, ilk SD dalgasının kor bölgesinde devam ettiği, orta derecede uzadığı ancak penumbrada geri dönüşümlü olduğunu ifade etmektedir. Membran potansiyellerinin 1-2 dakika sonra iyileştiği çevredeki iyi perfüze edilmiş dokuda kısa süreli olduğu orta serebral arter oklüzyon modelinde gösterilmiştir [54, 55]. Penumbral SD'nin gecikmiş doğası nedeniyle, inhibisyonlarının nörolojik iyileşme sunacak terapötik yaklaşımlar sunabilmektedir [56]. Bu SD'ler, enerji arz-talep uyumsuzluğunun bir sonucu olarak ortaya çıkıyor gibi görünmektedir [57, 58]. Birçok sekonder SD'nin kümülatif etkisi, metabolik durumun ilerleyici bir şekilde bozulması ve lezyonun genişlemesidir. Bu sadece sitotoksik membran yetmezliği nedeniyle değil, aynı zamanda bozulmuş nörovasküler bağlantılı hasarlı dokuda mikrovasküler daralmaya neden olan SD nedeniyle de meydana gelir. "yayılan

iskemi” olarak bilinen [59], SD'ye verilen bu ters hemodinamik veya başlangıçta vazokonstriktif yanıt, hücrel depolarizasyonun uzamasını ve dolayısıyla hücre ölümünü desteklemektedir [37, 41, 58, 60-62].

Na^+ / K^+ ATPaz, transmembran katyonik gradyanlarını düzenleyen ana taşıyıcıdır. Bu pompanın bozulması SD'ye yol açmaktadır. Pompa, adenozin trifosfatın (ATP) hidrolizi yoluyla üç sitozolik Na^+ 'yı iki hücre dışı K^+ ile değiştirir [63]. Bu nedenle, bu taşınmanın kendisi elektrojeniktir ve membran potansiyeline birkaç hiperpolarize edici milivoltta katkıda bulunur. Memeli gri maddesinde, Na^+ / K^+ pompası ATP hidrolizinin yaklaşık %50 'sinden sorumludur [64]. Kandaki oksijen ve glukoz eksikliği sonucu ATP üretimi baskılanır ve Na^+ / K^+ pompasının çalışmamasından dolayı Na^+ / K^+ akışı bozularak SD'ye sebep olmaktadır [65, 66]. Canlı kesitler incelendiğinde nöronların, oksijen–glukoz deprivasyonuna (OGD) yanıt olarak SD'ye maruz kaldıkları görülmüştür [67-69]. Benzer şekilde, SD'nin iskemi koşullarında *in vivo* olarak görüntülediği ve kaydedildiği çalışmalar da bulunmaktadır [70-72].

4.1.2. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite, eksitator amino asit reseptörlerinin aşırı veya uzun süreli aktivasyonundan kaynaklanan toksik etkileri ifade etmektedir [73, 74]. 1969'da Olney ve meslektaşları tarafından yapılan kapsamlı çalışmalar, aşırı glutamatın uyarıcı reseptörlere etki ettiği ve hücre ölümüne neden olduğu durumlarda kullanılan eksitotoksisite terimini ortaya çıkarmıştır [50, 54]. Beyindeki en bol nörotransmitter olan glutamatın aşırı uyarımı, postsinaptik iyon kanallarını doğrudan açarak ve ikincil olarak kalsiyum homeostatik mekanizmalarını etkileyerek hücre içi kalsiyum seviyesini artırır [75]. Eksitotoksisitenin iskemi, travma, epilepsi gibi hastalıklarda ve Alzheimer, Huntington, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir [76-80]. Hücre içinde yüksek kalsiyum birikimi, eksitotoksisiteye yol açan bir dizi olayı tetiklemektedir [81]. Nöronal hasara neden olan glutamatın toksik kaskadını durdurmak, etkilemek veya geçici olarak durdurmak amacıyla bir dizi ilaç geliştirilmiş ve kullanılmıştır [82-87]. Eksitator amino asit reseptörü aktivasyonunu modüle ederek bu hastalıkları hedef

alan terapötik stratejilerin geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir [88]. Sinirbilimde glutamat, uzun süreli potensiyelizasyonda kilit rol oynayan ve öğrenme ve hafıza için önemli olan bir nörotransmitterdir [89]. Glutamat nörotransmitter olarak dört kritere de uygunluğundan dolayı nörotransmitter olarak kabul edilmiştir [90]. Bu kriterler; i) presinaptik lokalizasyon, ii) fizyolojik uyarımlarla salınım, iii) doğal olarak oluşan transmitter ile ani etki, iv) transmitter etkisinin hızlı bir şekilde sona ermesi için gerekli mekanizmadır [89].

Glutamik asit, esansiyel olmayan 20-22 proteinogenik amino asitlerden biridir [89]. Glutamik asitin, karboksilat anyonları ve tuzları glutamat olarak bilinmektedir [91]. Memelilerde glutamat, esas olarak merkezi sinir sisteminde (beyin ve omurilik) bulunur ve nöronal haberleşme ve nörotransmitter olarak rol oynamaktadır [92]. Aslına bakıldığında, hemen hemen tüm beyin hücreleri haberleşme için glutamati kullanmaktadır. Ayrıca glutamat, glukoz yokluğunda beyin hücreleri için bir enerji kaynağı görevi görmektedir [93]. Beynin içindeki presinaptik nöronlar, postsinaptik nöronlar ve glial hücreler gibi üç farklı kısma etki etmektedir [90]. Bu terminallerden salınan glutamat, esas olarak astrositlere (astroglial hücreler) taşınır ve burada glutamin sentetaz yoluyla glutamine dönüştürülür. Glutamin daha sonra aktif olmayan bir formda glial hücrelerde depolanır, burada glutamat, bir mitokondriyal enzim olan fosfata bağımlı glutaminaz yoluyla rejenere edilir. Glutamat sadece iki uç (pre ve postsnaptik) arasındaki transmisyonu sağlamaz, aynı zamanda komşu sinapslardan salınan glutamat ekstra sinaptik sinyalizasyonla sinapslar arası haberleşmenin de gerçekleşmesini sağlamaktadır [93].

Glutamat, hızlı sinaptik transmisyon aracılığı eden temel nörotransmitterdir [94] ve sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza ve diğer bilişsel işlevlerde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, beyin parankimine yüksek miktarlarda yayılması söz konusu olduğunda büyük hasara neden olabilir [93]. Diğer sinyal maddeleri gibi, glutamatın sinyal etkisi de glutamatın kimyasal yapısına değil, hücrelerin glutamata maruz kaldıklarında nasıl tepki verecek şekilde programlandığına bağlıdır [94]. Sadece yüzeylerinde glutamat reseptör proteinleri (glutamat alıcıları) bulunan hücreler glutamata duyarlıdır, böylece glutamat bu reseptör proteinlerine bağlanarak

ve reseptör proteinlerini aktive ederek sinyal işlevini yerine getirmektedir [91]. Hücrelerin içindeki glutamat konsantrasyonu dışarıdakinden 10.000 kat daha fazladır ve hücre içi olduğu sürece nispeten etkisizdir [95]. Glutamat reseptörleri, yalnızca dışarıdan glutamat bağlanarak aktive edilebilir. Bu nedenle, düşük ekstraselular glutamat konsantrasyonlarını koruyan mekanizmalar normal beyin fonksiyonu için gereklidir [94]. Bundan dolayı, glutamatın doğru konsantrasyonlarda doğru yerde bulunması gerektiği, hem çok fazla hem de çok az miktarlardaki glutamatın zararlı sonuçları olduğu çıkmaktadır. Bu, glutamatın aynı zamanda hem gerekli hem de oldukça toksik olduğu anlamına gelmektedir [96].

Glutamat reseptörleri, iyonotropik ve metatropik olmak üzere iki büyük sınıfa ayrılmıştır. İyonotropik reseptörler NMDA, AMPA ve Kainat olmak üzere alt birimlere ayrılmaktadır.

Normal fizyolojik koşullar altında, glutamaterjik sinir terminallerinden salınan glutamat, postsinaptik reseptörlere etki eder ve depolarizasyona neden olur, bu da Ca^{+2} 'nin pordan geçmesine izin veren NMDA reseptör kanalından Mg^{+2} kationunun ayrılmasına neden olur [97]. AMPA reseptörleri genellikle sinapslarda NMDA reseptörü ile birlikte eksprese edilir ve burada öğrenme, hafıza, eksitotoksisite ve nöroproteksiyonda yer alan sinaptik plastisite süreçlerine ortaklaşa katkıda bulunurlar. Glutamaterjik uyarılma döneminde, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, AMPA reseptörünün yüzey varlığını modüle eden Ca^{+2} 'ye bağımlı hücre içi sinyal yollarını başlatmaktadır [98]. Postsinaptik membrandaki AMPA reseptöründeki modifikasyon, sinaptik mukavemette değişikliklere neden olur ve çeşitli sinaptik plastisite biçimlerinin düzenleyicisidir. Bu nedenle, korelasyonda çalışan tüm reseptörler glutamat salınımına neden olmaktadır [99].

Eksitotoksik hipotez, glutamat ve ilgili eksitatör amino asitler tarafından üretilen etkilerin, bir şekilde hasarlarına veya ölümlerine yol açan alıcı nöronların uzun süreli depolarizasyonundan kaynaklandığını göstermektedir [98]. Ayrıca, hücreler arasındaki boşluklarda (ekstraselular alan) glutamat seviyeleri çok yükseldiğinde, glutamatın uyarıcı etkisi nöronları öldüren bir toksin haline gelmektedir [99]. Ancak normal koşullar altında, nöronlar çevrede çok fazla glutamat varlığını algılar ve membran üzerindeki özel pompaları açarlar ve bu pompalar

sayesinde ortamda fazla bulunan glutamat hücre içine alınır [100]. Bu koruyucu pompalama işlemi, glutamat seviyeleri normal aralıkta kaldığı sürece titizlikle çalışır [101]. Bununla birlikte, hasarlı bir hücre glutamatını ekstraselular alana bırakırsa seviyeler keskin bir şekilde yükselebilir. Böyle bir durumda, hücre membranlarındaki pompalar artık bu durumla başa çıkamaz ve glutamatın toksik etkisi kendini göstermeye başlar [98]. Bu durum nöronu doğrudan öldürmez aksine, hücreyi aşırı derecede uyararak membranda bulunan kanalların aktivitesinin artmasına ve normalde yalnızca sınırlı miktarlarda girmesine izin verilen çok miktarda maddeye izin vermesine neden olur [102].

Glutamaterjik disfonksiyonla ilişkili nörodejeneratif hastalıklar [99], hücre sel kalsiyum homeostazının bozulması, nitrik oksit sentezinin aktivasyonu, serbest radikal oluşumu ve progresif nörodejenerasyona yol açan programlanmış hücre ölümünü içeren ortak bir patogenezi mekanizmasını paylaşmaktadırlar [103]. Bu mekanizmalar nükleik asitlere, proteinlere ve lipitlere zarar verir ve potansiyel olarak mitokondriyal permeabilitesini bozar. Bu da serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretimini daha da uyararak, enerji yetersizliğini kötüleştirir ve sitokrom c gibi proapoptotik faktörleri sitoplazmaya salabilir [104]. Yüksek düzeyde ROS oluşumu ve antioksidan mekanizmaların aşağı regülasyonu, nörodejeneratif hastalıklarda nöronal hücre ölümüyle sonuçlanır [105]. Dejeneratif sinir hastalıklarının hafıza dengesi, hareket, konuşma, nefes alma ve kalp fonksiyonu dahil olmak üzere vücudumuzun birçok faaliyetinin kötüleşmesine neden olduğu varsayılmaktadır [103].

Eksitotoksistide, glutamatın aşırı sinaptik salınımı, NMDA, AMPA, Kainat ve metatropik reseptörler gibi postsinaptik reseptörleri aktive ederek kalsiyum homeostazisinin bozulmasına neden olabilmektedir [105]. Aktivasyonları üzerine bu reseptörler, iyon kanallarını açarak Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının intraselular alana girişlerine neden olmaktadır. Özellikle NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu yüksek miktarda hücre içine giren Ca^{+2} ile hücre içerisindeki depolardan Ca^{+2} salınımını teikleemektedir. Özellikle epileptik nöbete, uyarının yayılmasına ve olası nöronal ölüme karşı savunmazsız olan Ca^{+2} mekanizmaları baskılayabilmektedir [106].

Geçmişte yapılan çalışmalarda glutamatla indüklenen nörotoksisitede, ekstraselular sodyumun ortadan kaldırılmasının kortikal hücre kültürlerinde nöronal ödem engellediği ancak dejeneratif değişikliklere etki etmediği görülmüştür. Bununla birlikte, ekstraselular kalsiyumun ortadan kaldırılmasının nöronal dejenerasyonu azalttığı görülmüştür [107, 108].

4.1.3. Oksidatif stres

İskemi-reperfüzyon ve inme sonrası hasarla ilişkili moleküler patenlerin (DAMP) salınması, oksidatif ve nitratif stres, nöroinflamasyon, eksitotoksisite ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi patolojik değişikliği indüklemektedir [109]. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin sistemik performansı ile biyolojik sistemlerin aktif ortamı detoksifiye etme veya hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik durumunu tanımlar [110]. Aşırı ROS, yukarıda açıklanan patolojik mekanizmaların birçoğuyla etkileşime girer ve inme sonrası ikincil beyin hasarına toplu olarak aracılık eder [111-113].

Glial hücreler, SSS'nin ana destekleyici hücreleri olarak işlevlerini göstermektedirler. Son çalışmalar, SSS'de oksidatif stresin düzenlenmesinde rol oynadıklarını göstermektedir. Bir yandan, inme sonrası redoks durumunun dengesizliğinden astrositler ve mikroglialar sorumludur [114]. Glial hücreler, çeşitli yollardan büyük miktarlarda serbest radikal salma potansiyeline sahiptir [115, 116]. Üretilen ROS, astrositlerde [117] inflamatuvar yolların aktivasyonunu teşvik eder, glutamat taşınmalarına müdahale eder [118] ve hücre içi ve hücre dışı mikro ortamın homeostazını etkiler. Mikroglia, inme sonrası KBB'nin bozulmasına aracılık eder ve inme sonrası nöral onarım sürecini etkiler [119]. Tersine astrositler, inme sonrası oksidatif hasardan korunmak için yüksek hücre içi antioksidan konsantrasyonlarını korumaktadırlar [120]. Glutasyon, glial hücreler tarafından sentezlenen ana antioksidandır ve oksidatif hasarı önlemede önemli bir rol oynar [121]. Hücre içi Nrf2-ARE yolu, glial hücrelerin ve nöronların redoks durumunu sinerjistik olarak düzenleyen ana antioksidan yoldur [122].

Oksidanlar olarak, ROS'ların fizyolojik dozları, vücudun fonksiyonel aktivitelerinin çeşitli yönlerinde aktif bir rol oynamaktadır. Bir yandan ROS,

makrofaj fagositozunu arttırmak ve T hücrelerini aktive etmek gibi bağışıklık fonksiyonlarının desteklenmesine katkıda bulunur [123]. Diğer yandan ROS, vasküler hücre proliferasyonunun ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Nitrik oksit (NO), kan damarlarında kan akışı homeostazını koruyabilmektedir [124]. ROS, yara onarımı sırasında çeşitli germinal faktörlerin salınmasını teşvik eder ve onarım sürecini kolaylaştırır [125]. Nörogelişim sırasında ROS, sinaptik plastisite ve hafıza oluşumu için gereklidir [126]. Ek olarak, araştırmacılar ROS'un kas hücresi gelişimi ve kasın yeniden şekillenmesinde de gerekli olduğunu bulmuşlardır [127]. Sonuç olarak, ROS sinyal molekülleri olarak işlev görebilir ve *in vivo* homeostaz, metabolizma, büyüme ve farklılaşmanın sürdürülmesinde yaygın olarak rol oynamaktadır.

Gliyal hücrelerdeki mitokondriyal metabolizma, redoks durumunun ve biyometabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [116]. Fizyolojik koşullar altında, elektron taşıma zincirinden (ETC) salınan elektronlar, süperoksit (O_2^-) üretmek için O_2 ile reaksiyona girmektedir. Astrositlerdeki serbest kompleks I, mitokondriyal ROS (mROS) üretiminin ana bölgesidir [128]. Mitokondrinin metabolik durumu O_2^- üretim hızını belirler. Solunumun inhibisyonu, iskemi veya hipoksiyi takiben mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmanın her biri elektron sızıntısına neden olur ve bu da reaktif oksijen türlerinin çıkış hızını önemli ölçüde artırır [129]. Edward ve ark. [130] bir sıçan serebral iskemi modelinde süksinatın reperfüzyon sırasında kompleks I' den hızlı süperoksit salınımını tetiklediğini bulmuşlardır. Ayrıca, daha yüksek ROS konsantrasyonları, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının (MPTP) ve iç zar anyon kanalının (IMAC) uzun süreli aktivasyonuna neden olabilmektedir. Yukarıdaki kanalların açılması, mitokondrinin içi ve arasındaki redoks homeostazındaki değişiklikleri değiştirerek ROS'un artışına neden olmaktadır. Bu ROS kaynaklı ROS salınımı (RIRR) mekanizması, ROS üretiminin ana kaynağı olarak mitokondriyi işaret etmektedir [131]. Süperoksit dismutaz (SOD), gliyal hücrelerin mitokondrisinde büyük miktarlarda bulunur ve süperoksiti oksijen ve hidrojen peroksit ayırmaktadır [132]. Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) da serbest radikallerin parçalanmasında rol oynamaktadır [133].

NADPH oksidaz, mitokondriden önemli ölçüde daha fazla ROS üretir ve ROS' u hücreden serbest bırakabilir [134]. Bu nedenle inme sonrası ROS' un anormal yükselmesinde anahtar faktör olarak kabul edilmektedir.

Toll benzeri reseptörler (TLR), glial hücre yüzeyinde NOX aktivasyonunu destekleyen önemli reseptörlerdir. TLR'ler, NOX fonksiyonel alt birimlerinin fosforilasyonuna ve oksidaz aktivasyonuna esas olarak MyD88'e bağımlı ve IL-1 reseptörüne bağımlı kinaz 4 (IRAK4) bağımlı yollarla aracılık eder [135, 136]. Kompleman reseptörü 3, iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y purinerjik reseptörleri dahil olmak üzere kalan yüzey reseptörleri, NOX'u esas olarak P38 MAPK ve ERK yolları üzerinden aktive etmektedir [137, 138]. Aktivasyonu üzerine NOX2, sitoplazmik elektronları hücre zarı boyunca taşır ve hücre dışı moleküler oksijeni süperoksit indirir. Salınan süperoksit, SOD3' ün katılımıyla hızla H₂O₂'ye dönüştürülür. H₂O₂ yüksek oranda lipide çözünür ve demir varlığında Fenton reaksiyonu yoluyla OH⁻ üretir ve bu da çoğu biyolojik bileşende oksidatif hasara neden olmaktadır [139].

Yukarıda tasvir edildiği gibi inmeden sonra oluşabilen oksijen radikallerine ve türevlerine ek olarak, biyolojik oksidasyon reaksiyonlarına reaktif nitrojen türleri (RNS) de dahil edilmektedir. İskeminin erken evrelerinde, endotelial NOS (eNOS) tarafından salınan NO'nun genellikle nöroprotektif bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir. Araştırmacılar, düşük NO dozlarının vazodilatasyona neden olabileceğini ve penumbra bölgesine kan akışını iyileştirebileceğini bulmuşlardır [140].

Ek olarak, Irina ve ark. eNOS eksikliği olan farelerin, subaraknoid hemorajdan sonra meydana gelen mikro dolaşım yetmezliği ve ölüm olasılığının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [141]. Bununla birlikte çalışmalar, glial hücrelerin esas olarak indüklenebilir NO'lar yoluyla patolojik koşullar altında büyük miktarlarda NO salgıdığını göstermiştir [142, 143]. Bununla birlikte, çalışmalar glial hücrelerin patolojik koşullar altında esas olarak indüklenebilir NOS (iNOS) yoluyla yüksek miktarlarda NO salgıdığını göstermiştir [142, 143]. Lipopolisakkarit (LPS) ve demir iyonlarının astrositlerde iNOS ekspresyonunu indüklediği ve NO üretimini teşvik

ettiği bulunmuştur [144, 145]. Fazla NO, O⁻ ile reaksiyona girerek kuvvetli oksitleyici bir peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur ve nitrozatif strese yol açar [146]. Geçici veya kalıcı serebral iskemiye maruz kalan farelerin, iNOS gen ekspresyonları düşürülerek veya NOS inhibitörlerini kullanılarak enfarktüs boyutlarının azalmış ve nörolojik işlevlerini daha fazla korudukları görülmüştür [147, 148].

SSS'nin ana nörotransmitteri olan glutamat; mesaj iletimi, aksonal yönlendirme, sinaptik plastisite ve nöronal büyüme ve gelişmede önemli bir rol oynamaktadır [149]. İskemiden sonra serbest radikaller, sinir hücrelerinden glutamatın hücre dışı salınımında rol oynamaktadır [150]. Hücre dışı boşlukta glutamat birikmesi eksitotoksositeye neden olmaktadır [151]. Glutamat, hücre zarının ozmotik gradyanını değiştirerek hücreye aşırı su ve klor girişine neden olarak nöronal ödeme neden olmaktadır. Ek olarak glutamat, NMDA ve AMPA gibi reseptörleri aktive eder ve bozulmuş Na⁺ / K⁺ ATPaz fonksiyonu kalsiyum iyonlarının intraselular alana geçişini destekler [152]. Fazla kalsiyum mitokondriyal matrikste birikerek mitokondriyal elektron taşıma zincirini bozar ve ROS üretimini artırır [153].

4.1.4. İnflamasyon

İskemik inme geliştikten sonra, doğuştan gelen karmaşık bir bağışıklık cevabını tetiklemektedir. Fokal beyin iskemisi, intraselular moleküllerin kontrolsüz salınımına yol açarak nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Ekstraselular alanda meydana gelen bu anormal madde birikimi steril inflamasyon denilen durumu uyarır [154]. Hasarla salınan anahtar intraselular moleküller, DAMP'ler gibi davranır ve örüntü tanıma reseptörleri (PRR) yoluyla inflamatuvar tepkileri başlatırlar. İnme bağlamında, NLR'ler (nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini, lösin bakımından zengin yineleme içeren reseptörler) veya NOD (nükleotid oligomerizasyon domaini) benzeri reseptörler ve TLR'ler gibi farklı PRR'ler söz konusudur [155]. TLR4 ve TLR2, HMGB1 (yüksek hareketlilik grubu kutu 1), ısı şoku proteinleri (HSP), esas olarak Hsp70, peroksiredoksinler, pürinler ve fibronektin, defensin veya heparin sülfat proteoglikan gibi birkaç endojen TLR2 / TLR4 ligandı gibi inmeyle ilişkili DAMP'ler tarafından aktive edilmektedir [156].

İnsanda meydana gelen inmeden sonra, DAMP'ler yükselir ve HMGB1 seviyeleri sonuçla ilişkilendirilmiştir [157, 158].

TLR'lerin uyarılması, proinflatuar genleri, sitokinleri, adezyon moleküllerini ve adaptif bağışıklığın aktivasyonunu indükleyerek doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini başlatır [159]. Ligand bağlanması ve inme ile ilgili olarak en fazla tanımlanmış TLR olan TLR4, dimerize olur ve MD2 ile bir kompleks oluşturur. Aşağı yönlü miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88'i (MyD88) - veya TIR domaini içeren adaptör indükleyici interferon- β (TRIF) - bağımlı sinyalleşmeyi başlatır, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunun erken ve geç evrelerinde rol oynar. Her iki durumda da, inflamatuvar sitokin üretimi için NF- κ B aktivasyonu gereklidir [160]. TLR4 yokluğu, inmeden sonra beyin hasarını ve inflamasyonu azaltmaktadır [161]. Dolaşımdaki insan bağışıklık hücreleri üzerindeki TLR4 ekspresyonu, inme hastalarındaki inflamatuvar yanıtla ilişkilidir [162]. İnmede doğal inflamasyonun başlaması için bir belirleyici olarak TLR4 aktivasyonunu gerektirmektedir. İnmeden sonra, DAMP'ler sadece beyinde yerleşik bağışıklık hücrelerini (mikroglia) aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda kan dolaşımına salındığında periferik bağışıklık hücrelerini de beyin içine alırlar. Dolaşımdaki bağışıklık hücreleri periferik olarak aktive edilerek beyne alınır ve burada inme sonrası inflamasyon ve rezolüsyona katkıda bulunurlar [156, 163].

Hasarlı beyinde inflamatuvar tepkiler, yerleşik miyeloid bağışıklık hücreleri olan ve hasardan sonra ilk yanıt veren mikrogliaların erken aktivasyonunu içermektedir. Bu yerleşik hücrelerin yerini kemik iliği kaynaklı hücreler almadığı için, periferik miyeloid hücrelerin eksik olduğu beyinle ilgili kapsamlı bir dizi fonksiyona sahip olmaları muhtemeldir. Mikroglialar homeostazda beynin sağlıklı işlevini sürdürmeye katkıda bulunurken, komşu hücre hasarını algıladıktan sonra sitokinleri ve kemokinleri serbest bırakırlar. Mikroglialar hasar bölgesinde hızlı ve özerk bir şekilde birleşmekte ve morfolojileri dallanmış bir görünümünden ameboid görünüme dönüşmektedir [164].

İNmede, birkaç reseptör bu mikroglial aktivasyona aracılık etmektedir. TLR4'ün, LPS [165] gibi patojenle ilişkili moleküler modellere maruz kaldıktan sonra mikrogliaada bulunduğunu ve TLR4 inhibisyonunun, LPS kaynaklı mikroglia

aktivasyonunu ve ROS üretimini [166] azalttığını gösteren deneysel kanıtlar, inme sonrası insan beyinde M1 benzeri bir proinflamatuvar fenotipe yol açan TLR'ye bağlı mikroglia aktivasyonunun meydana gelebileceği ve patolojiyi şiddetlendirebileceğini öne sürmektedir.

Farelerde yapılan çalışmalar, mikroglia yanıtının oldukça dinamik olduğunu ve bunun sonucunda erken M2 benzeri fenotiplerin geçici olarak patolojik M1 alt kümelerine geçiş izlediğini göstermektedir [167]. Bununla birlikte, anti-inflamatuar M2 fenotipik ikilemine karşı basit proinflamatuvar M1'den ziyade, *in vivo* mikroglia, dinamik zamansal özelliklere sahip çok daha büyük bir fonksiyonel ve fenotipik çeşitlilik göstermektedir [168]. Bu nedenle, bir dizi farklı transkripsiyonel program, bu hücrelerin beyin hasarına katılmasına izin verir, aynı zamanda örneğin ön-çözümleme sitokinlerinin salınması [169], ölü hücrelerin fagositozu ve doku onarımı için trofik faktörlerin salgılanması yoluyla lokal inflamasyonun rezolüsyonunu desteklemektedir. Purinerjik reseptörlerin aracılık ettiği mikroglial ek bir koruyucu rolü; uzantılarını hasarlı kan damarlarına doğru yönlendirerek lezyonu kontrol altına almak, rozet formasyonu oluşturmak, astrositik ATP salınımına atfedilen bir etki ve ardından P2RY12 mikroglia sinyallemesidir [170]. Mikroglialda P2RY12 ekspresyonu, lezyon kenarındaki dallanmış mikroglial aksine, yuvarlak miyeloid hücrelerin bulunduğu postmortem insan inme beyinlerinin lezyon çekirdeğinde azalır. [171]. Ek olarak, inme geçirmiş hastalarda mikroglia / makrofajlarda sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 6 aktivatörü (STAT6) aktivasyonunun, iskemik beyindeki inflamasyonun rezolüsyonunu destekleyen bir anti-inflamatuar fenotipi indüklediği tanımlanmıştır [172]. Anti-inflamatuar mikroglia [171] varlığını düşündüren inme [173, 174] geçirmiş hastaların hasar bölgesinde seçici radyo etiketli izleyiciler ve pozitron emisyon tomografisi (PET) ile mikroglial aktivasyon tespit edilmiştir. Mikroglial heterojenliğin önemini destekleyen farklı transkriptomik çalışmalar, mikroglialın yaşlanma, cinsiyet, farklı SSS bölgesi ve hastalığa bağlı fenotipik farklılıklarının da mevcut olduğunu göstermektedir [175, 176]. İnsan mikroglialında transkripsiyonel heterojenlik tanımlandığından [177], bu farklı heterojenliğin insanda inme üzerinde bir etkisi olup olmadığını aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Makrofajlar gibi mikroglialar da polarizasyona uğramaktadırlar. Daha önce de belirtildiği gibi, aktive edilmiş mikroglia, patofizyolojik koşullar altında klasik (proinflamatuvar; M1) veya alternatif (antiinflamatuvar veya koruyucu; M2) olarak tanımlanabilmektedir [178]. M1 ve M2 mikroglialarını ayırt etmenin temel yolu, salgılanan sitokinler ve kemokinlerin yanı sıra biyolojik işlevleridir. M1 mikroglia genellikle antijen sunan ve öldüren etkilere sahiptir ve güçlü bir inflamatuvar yanıt uyandırmak için çeşitli inflamatuvar faktörler salgılar. iNOS, M1 mikroglia için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Buna karşılık, M2 mikroglia, kalıntıları gidermek ve birçok anti-enflamatuvar ve onarım faktörü üretmek için fagositik aktiviteyi artırmaktadır. Arginaz 1 enzimi, M2 mikrogliasını en iyi karakterize eden belirteçlerinden biridir [179]. *In vitro* çalışmalar, mikroglianın polarizasyonunu düzenlemek ve incelemek için farklı indükleyicileri kullanmıştır; LPS ve interferon- γ (IFN γ) ile stimülasyon, M1 mikrogliasının farklılaşmasını teşvik ederken, IL-4 ve IL-10, M2 fenotipini indüklemektedir [167, 180-182]. İnterferon düzenleyici faktör (IRF) ailesinin yakın zamanda inme sonrası mikroglianın polarizasyonu ile önemli bir ilişkisi olduğu bulunmuştur [183-185]. Örneğin, IRF4 enflamasyonu negatif olarak düzenler ve makrofajın M2 [186] polarizasyonunu teşvik ederken, IRF5 M1 polarizasyonunu [187] indüklemektedir. IRF3, IRF7 ve IRF8 gibi diğer IRF'lerin de mikroglial polarizasyon sürecine katıldığı gösterilmiştir. Bu bulgu inme tedavisi için yeni bir bakış açısı açmaktadır [183].

İnmenin akut fazında, lezyondaki hasarlı hücreler ve penumbra, transforme edici büyüme faktörü (TGF)- α , silyer nörotrofik faktör, IL-1, IL-6 ve Kallikrein ile ilişkili peptidaz 6 [188] dahil olmak üzere sitokinleri serbest bırakır. Yanıt olarak, peri enfarktüs alanda reaktif astrogliozis oluşur ve SSS homeostazını korumak ve lezyonu sınırlamak için bir glial skar meydana gelir [22].

Reaktif astrogliozun ayırt edici özellikleri astrositik hipertrofi ve glial fibriller asidik proteinin (GFAP) aşırı ekspresyonudur [189]. Reaktif astroglioz geçirdikten sonra astrositler, IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IFN γ gibi proinflamatuvar araçlar ve NO, süperoksit ve peroksinitrit gibi serbest radikaller üretir ve serbest bırakırlar [188]. Buna karşılık astrosit proliferasyonu ve glial skar oluşumu, nöroinflamasyonun difüzyonunu kısıtlar [190].

Akut iskemik inmeden sonra birbiri ardına iskemik hemisfere çok sayıda periferik immün hücre geçisi gerçekleşmektedir. Dolaşımdaki nötrofil sayıları, semptom başlangıcından sonraki birkaç saat içinde üstel bir artış göstermekte ve bir hafta boyunca yüksek seviye kalmaktadır [191]. Deneysel çalışmalar, iskemik hemisferde nötrofil akümüülasyonunun 3 saat sonra önemli ölçüde arttığını, 24 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığını ve ardından 7 gün içinde sabit bir dağılıma izlediğini göstermiştir [192]. Kemokin benzeri faktör 1 (CKLF-1), C-X-C motifli kemokin ligand 1 (CXCL1), C-X-C motifli kemokin ligand 2 (CXCL2), C-X-C motifli kemokin ligand 5 (CXCL5), monosit kemoatraktan protein-1/C-C kemokin ligand 2 (MCP-1/CCL2), C-C kemokin ligand 3 (CCL3) ve C-C kemokin ligand 5 (CCL5), gibi güçlü nötrofil kemoatraktanlarının seviyelerinin hepsinin inmeden sonra önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Bu kemoatraktanlar, nötrofillerin yüzeyindeki C-C kemokin reseptörü 5'e (CCR5) ve C-X-C kemokin reseptörü 1'e (CXCR1) bağlanarak hasarlı beyin dokusuna göç eden ilk kan yoluyla taşınan bağışıklık hücrelerinin nötrofiller olmasını sağlamaktadır [193]. CKLF-1, nötrofillerin yüzeyinde CCR5'e bağlanarak inme sonrası 3 saatte önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. CKLF-1'in CCR5'e bağlanması, Akt/GSK3 β ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolaklarıyla nötrofil göçüne aracılık etmektedir [194]. Akut iskemik inmeli hastaların kanında, başlangıçtan sonraki 16 gün boyunca genel monosit sayıları önemli ölçüde artmıştır. Ek olarak, ipsilateral hemisferdeki monosit sayıları 1 gün sonra sağlam bir şekilde artmış, 3 - 7 gün sonra zirveye ulaşmış ve 14 gün sonra başlangıç seviyelerine geri dönmüştür [195]. Monositlerin ortak uyarana verdiği aktivasyon yanıtı büyük ölçüde, ligandı CCL2 ile ligasyona uğrayan klasik monositlerin yüzeyindeki reseptör olan CCR2'ye bağlıdır. Akut iskemik inmeli hastaların kanındaki T lenfosit sayılarının 7 gün içinde katlanarak azaldığı ve en düşük sayımın 12 saat sonra olduğu gözlemlenmiştir [191]. Lenfositler, eski iki bağışıklık hücresine kıyasla daha küçük sayımlarda ve daha uzun kalıcılıkta hasarlı hemisfere ekstrasvazyon yapmaktadır. İskemik yarımkürede T hücrelerinin birikimi, akut iskemik inmeden 24 saat sonra önemli ölçüde artmış, 3 günde zirveye ulaşmış ve bir ay boyunca devam etmiştir [196]. Çift negatif T hücresi (DNT) ve CD8⁺T hücresi infiltrasyonu iskemik hasarın ardından 3-24 saat boyunca önemli ölçüde artarken [192], kalıcı orta serebral arter oklüzyonu (pMCAO)

modelinde CD4⁺T hücrelerinin infiltrasyonunda 24 saate kadar artış görülmemiştir. [197]. Düzenleyici CD4⁺T hücrelerinin (Treg) lezyon bölgesinde birkaç gün sonra gecikmeli olarak arttığı ve inmeden 30 gün sonra da kalıcılığını koruduğu bulunmuştur (32). Doğal öldürücü (NK) hücrelerin, inmeden 3 saat sonra iskemik bölgeye sızdığı, 12 saatte zirveye ulaştığı ve en az 4 gün boyunca seviyesini koruduğu görülmüştür [198]. Treg ve gamadelta T hücrelerinin (gd T hücresi) atraksiyonuna ayrı ayrı CCL5/CCR5 ve CCL6/CCR6 eksenleri aracılık etmektedir [199, 200]. NK hücreleri iskemik bölgeye IP-10/CXCR3 ve CX3CL1/CX3CR1 eksenleri aracılığıyla alınmaktadır [201].

4.2. Terapi yöntemleri

1995 yılında IV-tPA'nın güvenliğini ve etkinliğini gösteren ilk önemli klinik çalışma, akut iskemik inme tedavisini tamamen semptomatik olmaktan çok zamana duyarlı bir konuya dönüştürdü. Semptom başlangıcından sonraki ilk 3 saat içinde IV-tPA uygulanırsa, hastaların 90 günlük süreçte yalnızca minimum sakatlığa sahip olma veya hiç sakatlık yaşamama olasılığının en az % 30 daha fazla olduğunu göstermektedir. Tedavi grubunda semptomatik kanamalardaki artışa rağmen IV-tPA ile plasebo grubu arasındaki mortalite farkının anlamlı olmadığı görülmüştür [202]. Yakın zamana kadar IV-tPA tek akut iskemik inme tedavisi olmasına rağmen, IV-tPA kullanımı Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm akut iskemik inme hastalarının % 3.2–5.2' sinde kullanılabilir [203]. Düşük tedavi oranının önemli bir nedeni de IV-tPA uygulaması için sınırlı zaman aralığıdır. Akut iskemik inmeden 3 ila 4,5 Saat sonra Alteplaz ile yapılan Avrupa Tromboliz çalışmasına dayanarak, Amerikan Kalp Derneği / Amerikan İnme Derneği (AHA / ASA) IV-tPA uygulamasını 2009'da 3 ila 4,5 saat arasında genişletti [203-205]. Bu uygulama ile IV-tPA kullanımını % 20'ye kadar artırdı [206].

Antikoagülanların yerine kullanıldığı veya kanama riskleri nedeniyle kontrendike olduğu durumlar dışında, geçici iskemik atak (TIA) veya iskemik inme sonrası hemen hemen tüm hastalara sekonder inmenin önlenmesi için trombosit önleyici ajanlar verilmelidir. Düşük doz aspirin, bu tedavinin temelidir. Günde 81-325 mg dozlar, tekrarlayan inme riskini yılda yaklaşık % 20 azaltmaktadır [207]. Dipiridamol ile birlikte klopidogrel ve aspirin, aspirine benzer şekilde riski

azaltmaktadır. Aspirine duyarlılığı olan hastalarda klopidogrel seçilebilmektedir. Uygun aspirin kullanımına rağmen şikayeti olan hastalar için her iki alternatif de seçilebilmektedir [208, 209]. Uzun süreli kullanım için çift antiplatelet tedavinin, tek ajan tedavisine göre uzun vadeli bir avantaj sağlamadığı bulunmuştur [210-212]. Kombine aspirin ve klopidogrel ile yapılan çift antiplatelet tedavinin, geçici iskemik inme veya düşük seviyeli inmeden sonraki ilk 3 hafta boyunca verildiğinde kalıcı fayda sağladığı yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur [213, 214].

Hiperbarik oksijen (HBO) reperfüzyon sırasında uygulandığında hasar hacminin şiddetini azaltma yeteneğini ortaya koyduğundan, HBO, inmeli hastalarda uygulanmasının olumlu bir potansiyel niteliği taşıdığı düşünülmektedir [215]. Öte yandan, literatürde yapılan bir çalışmada reperfüzyon sonrası uygulanan HBO'nun normobarik gruba kıyasla daha kötü sonuçlara yol açtığı görülmüştür [216]. HBO'nun inmede kullanımı, yetersiz çalışmalar nedeniyle insanlarda hala yeterince kanıtla dayalı değildir. Bugüne kadar, HBO'nun dozu ve uygulama süresi için tek tip bir kriter bulunmamaktadır. Ayrıca, HBO'nun ilaçlar ve diğer tedavi stratejileri ile birlikte etkileri ancak son zamanlarda araştırılmıştır. Bu nedenle mekanizmaları daha net tanımlamak ve HBO'nun akut iskemik inme hastaları üzerindeki etkisini araştırmak için daha deneysel ve özellikle klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [217].

Bazen aşırı hiperbarik durum veya uzun tedavi süresi oksijen toksisitesine, özellikle merkezi sinir sistemi toksisitesine, pulmoner ve orta kulak barotravmalarına ve nadiren retinopati ve prematüriteye neden olabilmektedir [217, 218]. 5 ATM'nin üzerindeki basınçlar muhtemelen beyin dokusunda serbest radikallerin yukarı regülasyonu nedeniyle ajitasyona veya epileptik nöbete neden olabilmektedir [219]. Bu nedenle, HBO yönergeleri 3 ATM'den büyük olmayan maksimum basıncı önermektedir [217, 220].

Normobarik oksijenin (NBO), *in vivo* elektron paramanyetik rezonans oksimetresi (EPRO) ile ölçülen sıçanlarda penumbral bölgedeki PtO₂'yi anlamlı derecede yükseltmiş olduğu görülmüştür [221]. Aynı araştırmacılar iskemi sırasında % 95 NBO'nun penumbral PtO₂'yi iskemik öncesi değerlere yakın tutabildiğini göstermişlerdir [222]. Laser speckle photometry kullanılarak yapılan bir çalışmada

postiskemik NBO'nun oksihemoglobin konsantrasyonunu ve serebral kan akışını arttırdığı ve iskemik çekirdek ve penumbra da peri-enfarktüs depolarizasyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [223]. Yine yapılan bir çalışmada NBO; hasar hacmini, nörolojik defisitleri ve ROS'u önemli ölçüde azalttığı ve ayrıca ATP üretimini artırdığı gösterilmiştir [224]. Ayrıca grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, NBO ve melatonin ikili uygulamasının 30 dakikalık MCAO modelinde nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak akut iskemik inme modelinde de nöronal hasarı, nörolojik defisitleri, hasar hacmini ve kan beyin bariyeri geçirgenliğini azalttığı ve serebral kan akışını artırdığı gözlemlenmiştir [225]. Son olarak reperfüzyonun hemen başında verilen NBO'nun, iskemi sonrası beyin hasarı, apoptoz ve nörodavranışsal hasarları önemli ölçüde azalttığını literatürde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [226].

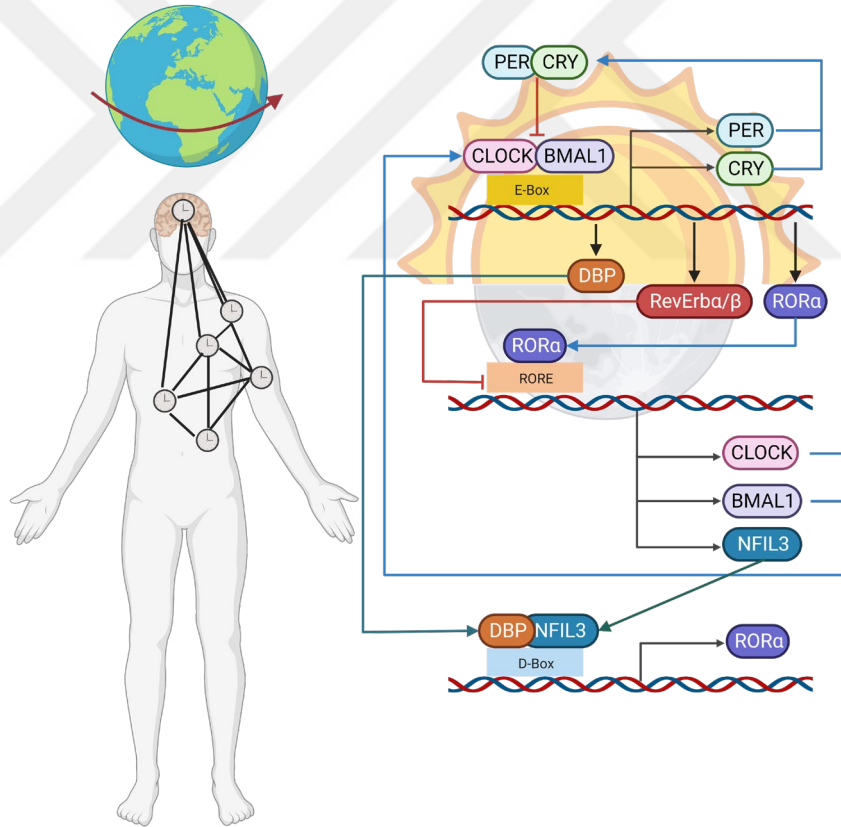
4.3. Sirkadiyen Ritim

Genel olarak, sirkadiyen (Latince *circa* 'yaklaşık' anlamına gelen ve 'gün' anlamına gelen *dies*) saat olarak adlandırılan biyolojik zamanlayıcının, maksimum hayatta kalma ve rekabet avantajı için günlük jeofizik döngüye uyum sağlamak ve kullanmak için yakınsak bir süreçte bağımsız olarak geliştiğine inanılmaktadır. Endojen dönem uzunluğu, Dünya'nın dönüşü tarafından dikte edilen doğal çevresel döngülerle sınırlandırılmıştır ve kesin periyodikliği sağlamak, iç ve dış ritimleri birleştirmek için oldukça karmaşık düzenleyici mekanizmalar gelişmiştir [227]. Saatler, sirkadiyen ritmin fazını ya da periyodunu belirleyen veya yeniden ayarlayan çok çeşitli sürükleyici sinyallere veya sözde zeitgeberlere (Almanca 'zaman verenler' anlamına gelir) kolayca yanıt verir. Ek olarak ışık, diğer harici (beslenme ve egzersiz gibi) [228] ve hücre içi (sıcaklık) [229] uyarıları etkileyebilmektedir. Uygun sirkadiyen ritimler sayısız hücre büyümesi ve hayatta kalma avantajı sağlamaktadır. Laboratuvar hamsterlerinde yapılan bir çalışmada, suprakiazmatik nükleusta (SCN) – hipotalamustaki ana pacemaker – meydana gelen bir lezyonun vahşi tip kemirgenlerde yaşam sürelerini kısalttığı gözlemlenmiştir [230, 231]. Sirkadiyen bozulmalar hayvan modellerinde veya insanlarda akut ölüme yol açmasa da zindelik ve sağlık üzerindeki kısa vadeli ve uzun vadeli olumsuz etkiler, sirkadiyen bozukluklardan kaynaklanabilmektedir [232].

Sirkadiyen sistem üç bileşenden oluşur: girdiler, osilatör ve çıktılar [227]. Bu temel dizayn ilkesi, sistemik ve hüresel [227] olmak üzere iki düzeyde çalışmaktadır. Sistemik ölçekte, ışık sirkadiyen sistem için önemli bir giriş sinyalidir ve ana pacemaker olan SCN'yi sıfırlar [233]. SCN'nin tanımlayıcı bir özelliği, periferel dokulardakine kıyasla osilatör hücreleri arasında sağlam ağ oluşturmasıdır [234]. Örneğin, *ex vivo* SCN kültürü raportör ekspresyonunun ritmikliğini 1 yıldan fazla sürdürebilirken [235], SCN dışındaki beyin bölgeleri 120 saat içinde bir kayıp ya da azaltılmış ritmiklik gösterirler [236]. SCN'nin ana işlevi, vücuttaki diğer beyin bölgelerini ve periferel dokuları nöral ve hormonal sinyallerle koordine etmektir [237]. Dahası, SCN epifiz bezinden melatonin ve adrenal korteksten glukokortikoidler ve katekolaminler gibi yayılabilir endokrin sinyallerin sirkadiyen sekresyonunu hipotalamik–hipofiz–adrenal eksen yoluyla düzenlemektedir [238, 239].

Hüresel düzeyde, hücre-otonom moleküler osilatörler birbirine bağlı negatif geri bildirim döngülerinden oluşur [227, 237, 240]. Memelilerde, transkripsiyon faktörleri sirkadiyen lokomotor çıkış döngüleri kaput (CLOCK) [241] ve nöronal PAS domaini içeren protein 2 (NPAS2), aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri protein 1 (ARNTL; BMAL1 olarak da bilinir) ile heterodimerler oluşturur [242]. Period sirkadiyen protein homologları 1, 2 ve 3 (PER1, PER2 ve PER3) ve kriptom 1 ve 2'yi (CRY1 ve CRY2) kodlayan genlerin ekspresyonunu, gün içinde E-kutu arttırıcı elemana doğrudan bağlanma yoluyla gerçekleştirmektedir [240]. Geç öğleden sonra veya akşam vakti, PER ve CRY proteinleri heterodimerize olur (ve ayrıca kazein kinaz 1δ (CK1δ) ve CK1ε ile etkileşime girer), çekirdekte yer değiştirir, sonrasında CLOCK ve BMAL1 ile etkileşime girerek transkripsiyonel aktivitelerini bastırırlar [240]. Bu arada, PER1, PER2, CRY1 ve CRY2'nin protein seviyeleri de spesifik E3 ligaz kompleksleri (sırasıyla β-TrCP ve FBXL3 [243-245] aracılığıyla poliubikitinasyon ve ardından degradasyonla azalmaktadır. Bu negatif geri bildirim baskısının kademeli olarak hafifletilmesiyle, CLOCK-BMAL1 transkripsiyon aktivitesi restore olur ve ertesi sabah yeni bir döngüye devam edilir. Bu temel geri bildirim döngüsü yaklaşık 24 saat sürmektedir.

İki nükleer reseptör ailesi, çekirdek döngüyü stabilize etmek ve çıktı transkripsiyonunu ayrı bir fazda yönetmek için işlev görmektedir. Rev-Erb α ve Rev-Erb β [246] (sırasıyla NR1D1 ve NR1D2 genleri tarafından kodlanmaktadır) ve RAR ile ilişkili orfan reseptörleri α , β ve γ (ROR α , ROR β ve ROR γ) [247], aynı zamanda CLOCK-BMAL1'in doğrudan hedefleridir, ROR/REV-ERB-yanıt elementlerine (RORE) kompetitif bir şekilde bağlanarak BMAL1'i antagonistik olarak düzenler ve BMAL1 ile PER2 arasında bir antifaz salınımına neden olur. Üçüncü bir transkripsiyonel döngü, prolin ve asidik amino asit bakımından zengin bazik lösin fermuar (PAR-bZIP) proteinlerini (DBP, TEF ve HLF) ve baskılayıcı E4 promotör bağlayıcı protein 4'ü (E4BP4; NFIL3 olarak da bilinir) [237] içermektedir. Bunlar kompetitif olarak D-kutularına bağlanır ve sırasıyla CLOCK-BMAL1 döngüsü veya REVERB-ROR döngüsü tarafından kullanılır (Şekil 4.3.1.).



Şekil 4.3.1. Sirkadiyen ritim döngüsü.

Birlikte, bu üç birbirine bağlı geri bildirim döngüsü, promotörlerinde ve arttırıcı elementlerinde cis elementlerine (E-box, RORE ve D-box) bağlanarak çok

sayıda hedef genin ekspresyonunu yönlendirebilirler [237]. ‘Saat kontrollü genler’ olarak adlandırılan bu genler, oldukça dokuya özgüdür ve iki farklı dokuda belirgin şekilde farklı sirkadiyen faz dağılımları sergilerler [248, 249]. Dahası, farelerde 12 dokunun incelenmesi sonucu, tüm genlerin % 43’ünün en az bir dokuda salındığını ortaya koymuştur [250]. Dikkat çekici bir şekilde, erkek babunlarda 64 dokuya ve beyin bölgesine yapılan artmış profillemeye sonucunda, en az bir dokudaki protein kodlayan salınımlı genlerin oranının % 80’den fazla olduğunu göstermiştir ve bu da gen ekspresyonunun sirkadiyen kontrolle ilişkisi olduğunu göstermektedir [251]. Dokuya özgü ritmik gen ekspresyonu, hem merkezi hem de yerel sirkadiyen saatler tarafından ortaklaşa kontrol edilmektedir.

Sirkadiyen gen regülasyonu, yalnızca yukarıda belirtilen sirkadiyen faktörleri değil, aynı zamanda ikincil veya hücre tipine özgü transkripsiyon faktörlerinin, transkripsiyon eş düzenleyicilerinin ve epigenetik aktivitelerin büyüyen bir listesini de içeren karmaşık, zamansal olarak düzenlenmiş bir süreçtir [227]. Bu şekilde dokuya özgü sirkadiyen ekspresyonun mekanik temeli ortaya çıkmaktadır [252, 253]. Örneğin, hepatosit nükleer faktör 4 α (HNF4A) transkripti, fare karaciğerinde ritmik olarak düzenlenir ve CLOCK–BMAL1 aktivitesinin bastırılması yoluyla sirkadiyen ritimleri modüle etmektedir [253]. Ayrıca, adacık hücrelerinin transkriptomik analizi, insülin salgılanmasında rol oynayan genlerin sirkadiyen ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır [252]. Epigenetik düzenleme aynı zamanda aktif bir araştırma alanıdır ve histon modifikasyonları, kromatin yeniden biçimlendirmesi ve topolojik organizasyon, hem E-kutu hem de RORE elementlerinin düzenlenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [227, 254]. Son kanıtlar, transkripsiyonel düzenlemenin yanı sıra, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası mekanizmaların da tüm organizmalarda ritmik fizyolojide önemli düzenleyici rollere sahip olduğunu göstermiştir [245, 255, 256].

4.4. Sirkadiyen Ritim ve Serebral İskemi

İnmedeki klinik mekanizmalar karmaşık olmasına rağmen, iskemik dokudaki ilk yanıt, oksijen ve glukoz arzını bozan bir kan akışı kaybından kaynaklanmaktadır. Mitokondriyal fonksiyon ve ATP regülasyonunun tümü sirkadiyen salınım göstermektedir. Hipoksiye birincil yanıt aracısı olan hipoksiye indüklenbilir faktör 1

(HIF1), ana sirkadiyen genlerle etkileşime girer [257]. Bu nedenle, doku düzeyinde beynin iskemiye yanıtı inme başlama zamanına bağlı olmaktadır. Hücresel düzeyde, ortaya çıkan literatür, sirkadiyen biyolojinin nörovasküler üniteadaki tüm hücre tiplerini etkileyebileceğini göstermektedir.

Nöronlar, eksitotoksisite ve oksidatif / nitrozatif strese karşı savunmasızdır ve her iki yol da sirkadiyen biyolojiden etkilenmektedir. Kemirgen beyin travması modellerinde ekstraselular glutamat ve NMDA reseptör seviyelerinin günün saatine bağlı olduğu görülmüştür [258]. Bir fare kalp durması modelinde, hipokampal kalbindinin eksitotoksik azalmalarının, Zeitgeber zamanı ZT14'te maksimum olduğu gözlemlenmiştir [259]. Benzer şekilde, antioksidan genler için de günlük varyasyonlar mevcuttur [260]. Sirkadiyen kontrollü bir gece hormonu olan melatonin, güçlü bir antioksidan ve potansiyel nöroprotektandır [261] ancak etkileri glutamat ve GABA'da günlük ritimleri bozabilmesi nedeniyle karmaşık olabilir [262]. Sirkadiyen genler ile ROS'ları düzenleyen enzimler arasında önemli bir karışma vardır [263]. Per2 eksikliği olan hücreler ROS'a karşı daha savunmasızdır [264]. Oksijen-glukoz deprivasyonuna maruz kalan nöral kültürlerde, *in vitro* sirkadiyen benzeri döngülerin uyarılmasından glutamat ve ROS seviyeleri etkilenmiştir [265]. *In vivo* olarak, fokal serebral iskemiden sonra p53 ve protein kinaz B (Akt) tarafından düzenlenen nöronal hasar, Zeitgeber zamanına göre değişmiştir [11]. Sirkadiyen Bmal1 geninin nakavt edilmesi redoks savunmasını aşağı yönlü regüle etmekte ve oksidatif hasarı artırmaktadır [266]. Bmal1 ve Per2 ayrıca apoptosis ve otofajinin düzenlenmesine katkıda bulunabilir.

Toplamda, eksitotoksisite, oksidatif stres ve hücre ölümü üzerindeki bu sirkadiyen etkiler, *Per1* nakavt farelerin serebral iskemiye daha duyarlı olduğu gözlemiyle tutarlı olabilir [267]. Ayrıntılı moleküler mekanizmalar incelenmeye devam etse de, ortaya çıkan bu literatür sonucu, insanda inme üzerinde yapılmaya çalışılan nöroprotektan çalışmaların, gece hareketli fazda olan kemirgenler ile aynı aktif zaman diliminde yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Sirkadiyen sinyalleşme glial hücreleri de etkileyebilmektedir. Ekstraselular glutamat, astrositik kalsiyum ile koordineli olarak bir sirkadiyen ritim

sergilemektedir [268]. Astrositlerdeki ATP salınımı ve ROS tamponlama kapasiteleri *Bmal1*'e bağlıdır [269]. Astrosit fonksiyonu üzerindeki bu sirkadiyen etkilerle tutarlı olarak, Clock defisit astrositlerle birlikte kültüre edilen nöronların ROS'a karşı daha duyarlı hale geldikleri görülmüştür [270]. Sirkadiyen etkiler beyaz maddede de etkilidir. Fare oligodendrositlerinin ve oligodendrosit öncüllerinin mikrodizi analizi, fosfolipid sentezi, miyelinasyon ve proliferasyonda yer alan genlerin inaktif fazda yukarı yönlü regüle edildiğini, apoptoz, stres tepkisi ve farklılaşmada yer alan genlerin ise aktif fazda etkinliğinin arttığını göstermiştir [271].

İnme için vasküler kompartımanın sirkadiyen regülasyonu son derece önem teşkil etmektedir. Örneğin, serebral arterlerin dinlenme tonundaki salınımlar 24 saatlik bir döngü gösterir [272] ve eNOS gibi vazoaktif genler sirkadiyen genlerle etkileşime girer [273]. Penumburada, kan akışı aktif ve inaktif fazlar arasında farklılık gösterebilmektedir [265]. Sirkadiyen biyoloji, KBB'nin işlevini de etkilemektedir [274]. *Drosophila* modellerinde, uyku-uyanıklık döngüleri KBB'nin permeabilitesini etkilemektedir [275] ve *Bmal1* nakavt farelerde, beyin mikrodamarlarının perisit örtme yaşı azalmış ve bu da sızdıran bariyerlere neden olmuştur [276]. Beyin omurilik sıvısı üretiminde inaktif fazda daha yüksek klirens oranları ile [277] belirgin bir günlük varyasyon bulunmaktadır [278]. Glimfatiklerin [34] ve bunların servikal lenf nodları [279] ile bağlantılarının farelerde inme sonrası ödem, inflamasyon ve ikincil hasara katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle sirkadiyen biyolojisinin KBB patofizyolojisini ve reperfüzyon tedavilerinden sonra ödemi etkilemesi olası gözükmektedir.

İskemi için tartışılan nörovasküler birim mekanizmaları hemoraj ile de ilgili olabilir. Farelerde subaraknoid kanamanın indüklenmesi, ZT12 sırasında *Per1* ve *Per2*'de ZT2'ye kıyasla daha fazla yükselmelere neden olur ve bu, hem oksijenaz 1 (HO-1) ekspresyonu ve nöronal apoptozda daha fazla azalma ile ilişkilidir [280]. Tersine, HO-1 nakavt farelerde, saat genlerinin ekspresyonu azalmış ve hasar artarken, HO-1 tarafından üretilen karbon monoksit ile tedavi sonucu, saat gen ekspresyonu geri kazanılmış ve nöronal apoptozun azaldığı gözlemlenmiştir. Ich'nin fare modellerinde uyku-uyanıklık düzenleri bozulduğu ve mikroglial aktivasyonun şiddetlendiği görülmüştür [281]. Sirkadiyen biyoloji ile kanama arasındaki bu

bağlantı insanlarda da belgelenmiştir. Beyin omurilik sıvısında Per2 ekspresyonu, yırtılmış anevrizması olan hastalarda, yırtılmamış anevrizması olan kontrollere kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür [280].

Sirkadiyen biyoloji inmeden sonraki iyileşmeyi de etkileyebilir. Nöral kök hücrelerde farklılaşma için saat genleri gereklidir [282] ve farelerde sirkadiyen döngülerin bozulması hipokampal nörogenezde değişikliklere yol açmaktadır [283]. Zebra balığı modellerinin geliştirilmesinde, anjiyogenez Bmal1 ve Per2 tarafından modüle edilmiştir [284]. Tümör kan damarlarının hipoksik regülasyonu sirkadiyen ritim gösterir [285]. Bu nedenle, sirkadiyen biyolojinin yeniden şekillenen nörovasküler birimi nasıl etkilediğine dair daha derin bir anlayış, inme iyileşmesi ve rehabilitasyonu için tedavilerin optimizasyonunu iyileştirmeye yardımcı olabilir.

Sirkadiyen gen ekspresyon paternleri, yaş ve cinsiyete bağlı olarak farklı beyin bölgelerinde çeşitlilik gösterebilmektedir [236, 286]. Bu nedenle inmedeki sirkadiyen etkilerin lezyonun konumuna ve hastanın geçmişine bağlı olması mümkün gözükmemektedir.

4.5. Rev-Erba ve Rev-Erbβ

Rev-Erba, 17. kromozomda bulunan Nr1D1 geni tarafından kodlanırken, Rev-Erbβ 3. kromozomda bulunan Nr1D2 geni tarafından kodlanmaktadır. Rev-Erba, kanonik domain yapısı ve dizisine bakılarak nükleer hormon reseptör ailesinin orfan bir üyesi olarak tanımlandı [287]. Rev-Erbβ daha sonraları diğer nükleer hormon reseptör aileleriyle olan homolojisi ve Rev-Erba ile büyük ölçüde örtüşen ekspresyon paterni ile tanımlandı. Her iki reseptör de sirkadiyen döngüye bağlı olarak [288-290] karaciğer, adipoz doku, iskelet kası ve beyinde [287] yüksek ekspresyona sahiptir. Rev-Erb'ler, koaktivatör tanıma için gerekli olan karboksi terminal kuyruktan (helix 12) yoksun olmaları sebebiyle nükleer hormon reseptör ailesinde benzersizdirler. Her iki reseptör de transkripsiyonun konstitütif baskılayıcısı olarak işlev görür ve RORE denilen DNA yanıt elementlerine bağlanırlar [291]. Rev-Erba'nın işlevi hakkında Rev-Erbβ'ninkinden çok daha fazla şey bilinmesine rağmen, ekspresyon modellerindeki ve DNA bağlanma ve

transkripsiyonel aktivitelerindeki benzerlikler, işlevlerinde önemli ölçüde örtüşme olasılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir.

Rev-Erb α ve Rev-Erb β sirkadiyen ritmin oluşumunda [292, 293] ve birçok dokunun normal işlevinde çalışmasında önemli rolleri bulunmaktadır [294-298]. Rev-Erb α 'nın ilk olarak, Gram negatif bakteriler ile ilişkili lipopolisakkarite karşı doğal bağışıklık yanıtını uyararak Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) genini baskılayarak makrofajlardaki proinflamatuvar sinyallerin bloke edilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir [299]. İnsan makrofajlarında, Rev-Erb α 'nın farmakolojik olarak uyarılması sonucu proinflamatuvar stokin olan IL-6'nın üretimini azalttığı, Rev-Erb α yokluğunda ise IL-6 miktarının arttığı gözlemlenmiştir [300]. Rev-Erb α null farede hiperaktivite ve bozulmuş hafıza formasyonunun da dahil olduğu davranışsal anomaliler gözlemlenmiştir [294]. Ayrıca bu tip farelerin orta beyin dopaminerjik nöronlarındaki işlev bozukluklarını gösteren artan saldırganlık, kaygı ve depresyonla ilişkili davranışlar sergiledikleri görülmüştür [301]. Rev-Erb α 'nın makrofajlardaki proinflamatuvar sitokin olan IL-6 ekspresyonunun temporal salınımindan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada Rev-Erb α 'nın, NLRP3'ü direkt olarak baskıladığı ve dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş kolite karşı koruma sağladığı görülmüştür [302]. Rev-Erb α 'nın SR9009 ve GSK4112 gibi küçük moleküllü agonistlerle farmakolojik hedeflemesi, akut veya kronik inflamasyonla ilişkili hastalıklara karşı potansiyel anti-inflamatuvar terapötikler olarak düşünülmektedir [14, 303, 304]. Yapılan bir çalışmada Rev-Erb α 'nın SR9009 ile agonist olarak uyarılması sonucu, BMAL1 ekspresyonundan bağımsız olarak, pro-inflamatuvar sitokin üretimini ve inflamatuvar monosit infiltrasyonunu baskıladığı görülmüştür. Aynı zamanda bir çalışmada Rev-Erb α agonisti, SR9009, uygulaması sonucu psoriatik dermatitiste (sedef hastalığı), IL-17'nin baskılanması üzerinden iyileşme olduğu görülmüştür [305]. Literatüre bakıldığında bir kemokin olan CCL2'nin ve onun reseptörü olan CCR2'nin, obezitenin indüklediği inflamasyonun başlatılmasında ve beyaz yağ dokusunda makrofajların toplanmasında önemli rolü olduğu görülmektedir [306]. Yapılan bir çalışmada Rev-Erb α 'nın insandaki immunitenin başlamasında görevli genlerden biri olan CCL2 ile ilişkili olduğunu göstermiştir [297, 307]. Bir diğer çalışmada da Rev-Erb α 'nın CCL2 genini direkt

olarak baskıladığı ve RevErb α 'nın makrofajların inflamatuvar fonksiyonlarını ve CCL2 ile aktive olan intraselular sinyalleri baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca farelerdeki RevErb α eksikliğinde de makrofajlardaki CCL2 gen aktivasyonunun arttığı belirtilmiştir [307].

Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin ikili mutasyonu sonucu bronşiyal epitelde inflamatuvar tepkilerin ve kemokin aktivasyonlarının arttığı bulunmuştur. Ancak tekli mutasyonlarda Rev-Erb β 'nin etkinliğinin Rev-Erb α kadar baskın olmadığı görülmüştür [308]. Bir çalışmada, Rev-Erb α ve Rev-Erb β için global tekli nakavt fareler üretilmiş ve Rev-Erb α 'nın homozigot delesyonunda gözlenen postnatal ölümler, Rev-Erb β 'da görülmemiştir. Ayrıca homozigot Rev-Erb α delesyonu sonucu yaşayabilen hem dişi hem de erkek farelerde azalmış fertilité gözlemlenmiştir [292]. Yapılan bir çalışmada Rev-Erb α delesyonunun spontan mikroglial ve astrosit aktivasyonuna, artmış mikroglial NF- κ B sinyallemesine ve nöronal hasara neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda, Rev-Erb α 'nın farmakolojik aktivasyonu sonucu beyindeki inflamasyonun baskılandığı görülmüştür [14].

Bu bağlamda Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin beyindeki inflamatuvar süreçlerdeki etkileri göz önüne alındığında, akut inme gibi beyinde yüksek seviyede inflamatuvar süreçlere neden olan patofizyolojik bir rahatsızlığa karşı etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu tez kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin akut iskemik inme üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

5. MATERİYAL METOT

5.1. Deney Planı ve Deney Grupları

Bu tez çalışmasındaki deney hayvanı çalışmalarının tamamı etik standartlara, Helsinki Deklarasyonu'na, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Karar no: 17/2020) sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Bu tez çalışması için toplam 80 adet 8-12 haftalık erkek C57BL6/J faresi kullanılmıştır. Hayvanlar 12 saat gündüz/gece periyoduna uygun şekilde bakılmıştır. Beslenmeleri *ad libitum* ile sağlanmıştır. Deney hayvanlarının temini ve bakımı İstanbul Medipol Üniversitesi REMER tarafından karşılanmıştır.

Proje kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin akut beyin hasarındaki rolünün araştırılabilmesi için, dünya genelinde serebral iskemi vakalarının yaklaşık %85 gibi büyük bir bölümünü kapsayan orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) modeli kullanılmıştır [309, 310]. Projede belirlenen hedeflere ulaşılabilmesi için aşağıda bulunan deney grupları oluşturulmuştur.

Lv-GFP: Moleküler klonlamaların yapıldığı Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün fare beyninde herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılabilmesi için oluşturulmuş deney grubudur (n=10).

Lv-RevErb α : Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün içerisine klonlanmış Rev-Erb α 'nın protein kodlama bölgesi sayesinde Rev-Erb α aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulmuş deney grubudur (n=10).

Lv-RevErb β : Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün içerisine klonlanmış Rev-Erb β 'nin protein kodlama bölgesi sayesinde Rev-Erb β aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulmuş deney grubudur (n=10).

Lv-RevErb α + Lv-RevErb β : Hem Lv-RevErb α ile Rev-Erb α aktivasyonunun, hem de Lv-RevErb β ile Rev-Erb β aktivasyonunun beraber göstermiş olduğu etkilerin incelenebilmesi için oluşturulmuş deney grubudur (n=10).

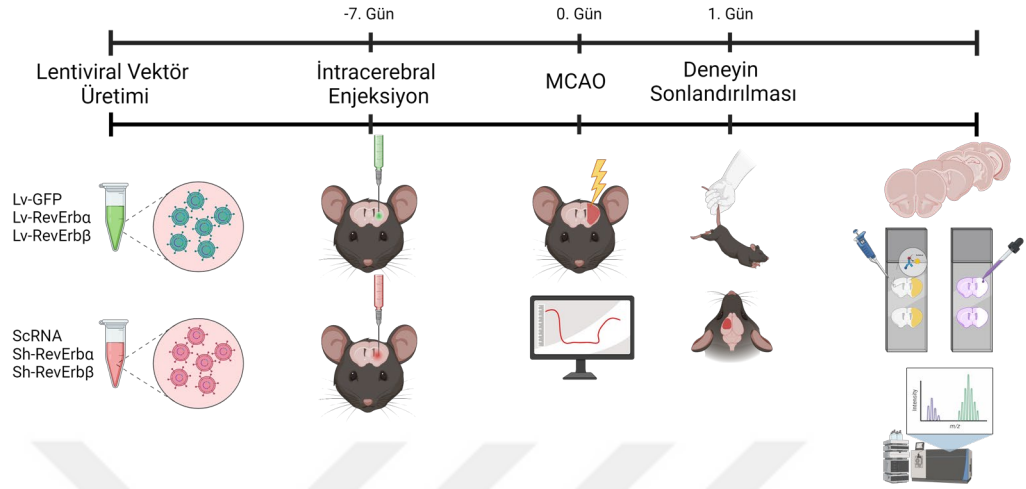
ScRNA: Lentiviral pLVTHM plazmidinin fare beyinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının analizi için içerisine fare genomunda herhangi bir geni hedef almayan gen dizisi yerleştirilmiş kontrol grubudur (n=10).

Sh-RevErb α : Nr1d1 gen dizisini hedef alarak Rev-Erb α protein seviyesinin azaltılmasının hedeflendiği deney grubudur (n=10).

Sh-RevErb β : Nr1d2 gen dizisini hedef alarak Rev-Erb β protein seviyesinin azaltılmasının hedeflendiği deney grubudur (n=10).

Sh-RevErb α + Sh-RevErb β : Sh-RevErb α aracılığıyla Rev-Erb α 'nın ve Sh-RevErb β aracılığıyla Rev-Erb β 'nin beraber inhibe edilmesinin hedeflendiği deney grubudur (n=10).

Proje kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin serebral iskemi sonrasında farelerin nörolojik durumu, enfarktüs hacmi, beyin ödemi ve KBB geçirgenliği üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ürettiğimiz lentiviral vektörlerin hedef dokuya uygulanmasından sonra enfekte olması yaklaşık 5-7 gün arası sürmektedir. Bu nedenle, ilgili virüs enjeksiyonları (Lv-GFP, Lv-Rev-Erb α , Lv-Rev-Erb β , Lv-Rev-Erb α + Lv-Rev-Erb β , scRNA, sh-Rev-Erb α , sh-Rev-Erb β , sh-Rev-Erb α + sh-Rev-Erb β) MCAO operasyonlarından 7 gün önce yapılmıştır. Planlanan deney düzeninde 90 dakikalık MCAO'yu takiben 24 saat reperfüzyon modeli kullanılmıştır (**Şekil 5.1.1.**). Bu modelin özellikle serebral iskemi sonrası beyin ödemi, hasar alanı, kan beyin bariyeri geçirgenliği ve nörolojik hasarın gözlemlenebilmesi ve değerlendirilebilmesi için uygun bir metot olduğu bilinmektedir [311, 312].



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.

5.2. Moleküler Klonlama Çalışmaları

Moleküler klonlama çalışmaları ve virüs üretimi, İstanbul Medipol Üniversitesi REMER bünyesinde yapılmıştır. Yaptığımız bu proje kapsamında farelerde Rev-Erb α ve Rev-Erb β protein seviyelerini arttırabilmek veya azaltabilmek için yüksek miktarda virüs partikülü elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla REMER bünyesinde bulunan Kılıç Laboratuvarı'nda rutin olarak hem *in vivo* hem de *in vitro* ile uyumlu olan ikinci jenerasyon lentiviral vektörlerin bu projede kullanılması hedeflenmiştir.

Rev-Erb α/β protein seviyesi arttırabilmek için GFP protein anlatımı içeren bisitronik vektör (Lenti-EF-1 α -GFP-2A-Puro Vector, ABM) kullanılmıştır (**Şekil 5.2.1.**). Rev-Erb α/β protein ifadesini baskılamak için ise GFP içeren pLVTHM (<https://www.addgene.org/12247/>) kullanılmıştır (**Şekil 5.2.2.**). Ayrıca, virüs üretimi için paketlenme plazmidi olarak psPAX (<https://www.addgene.org/12260/>) ve zarf plazmidi olarak pMD2.G (<https://www.addgene.org/12259/>) kullanılmıştır.

5.2.1. Rev-Erba (Nr1d1) ve Rev-Erbβ (Nr1d2) primer dizaynı

Rev Erb-α protein seviyesini arttırmak amacıyla bu proteinin gen kodlama bölgesi (Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (Nr1d1), mRNA; NCBI Referans numarası: NM_021724.5) kullanılmıştır (Şekil 5.2.1.1.).

```
1 agagtgaat attactgccg agggaacgta gcagggcaca cgtctcgcct ctttgcgact
61 cggtgccccg tttctcccca tcacctactt acttctcgtt tgcaacctct cttcctctgg
121 gacttttgca ccgggagctc cagattcgcc accccgcagc gctgcggagc cggcaggcag
181 aggcaccccc tacactgcag agaccgcacc ctcttgta ctttctagcc agaactactg
241 caggctgatt cccctacac actctctctg ctcttcccat gcaaagcaga actccgttgc
301 ctcaacgtcc aacccttctg cagggtgca gtcggccac cccaagacct tgctgcaggg
361 tgcttcggat cctgatcgtg agtcgctggg tccactcccc gcccttagcc agtgcaccag
421 gggcaacagc ggcgatcga acctctagtt tgagtcaagg tccagtttga atgaccctc
481 tcagctgggt aagacatgac gacctggac tccaacaaca acacaggtgg cgtcatcacc
541 tacattggct ccagtggctc ctcccgaagc cgcaccagcc ctgaatccct ctatagtga
601 aactccaatg gcagcttcca gtccctgacc caaggctgtc ccacctactt cccaccatcc
661 cccactggct cctcaccaca agaccggct cgctccttg ggagcattcc acccagctg
721 agtgatgacg gctccccttc ttctcatct tctcgtcgt catcctctc ctcttctat
781 aatgggagcc cccctgggag tctacaagtg gccatggagg acagcagccg agtgcccc
841 gcaagagca ccagcaacat caccaagctg aatggcatgg tgttactgtg taaagtgtgt
901 ggggacgtt cctcgggctt cactacggg gtgcacgctc gcaggggctg caaggcttt
961 ttccgtcggg gcatccagca gaacatccag taaaaaagg gtctgaagaa tgagaattgc
1021 tccatcgtcc gcatcaatcg caaccgctgc cagcaatgct gttcaagaa gtgtctctc
1081 gtggcatgt ctcgagacgc tgtgcgtttt gggcgatcc ccaaacgaga gaagcagcgg
1141 atgcttgctg agatgcagag tgccatgaac ctggcaaca accagttgag cagccagctg
1201 ccgctggaga cttcaccac ccagcaccac acccagcc ccatggccc ctcgccacc
1261 cctgctcggg tccccacc cctggggg tctcccagt ttccacaaca gctgacgct
1321 cccagatccc caagcctga gccacagtg gaggatgta tatcccaggt ggcccgggc
1381 catcgagaga tcttcaacta cgccatgac aagctgggca gctcacctgg caacttcaat
1441 gccaacatg catcagtag ccctccagcc accaccacc atcgtggga aaatcagggc
1501 tgcccacctg ccccaatga caacaacacc ttggctgcc agcgtcataa caggggccta
1561 aatggctgc gccaggctc ctctctac cctcccact ggctccttg ccctgcacac
1621 cacagctgc accagtcaa cagcaacggg caccgtctat gccaccaca cgtgtatgca
1681 gcccagaag gcaaggcacc tgccaacagt cccggcagg gcaactcaa gaatgtctg
1741 ctggcatgct ctatgaacat gtaccgcat ggacgcagtg ggcgaacgt gcaggagatc
1801 tgggaggatt tctccatgag cttcacgcc gctgtcggg aggtgtaga gtttgcaaa
1861 cacatccgg gcttcctga ctttctcag catgaccaag tcacctgct taaggctggc
1921 accttgagg tgctgatggt gcgcttctc tctgttca acgtgaagga ccagacagtg
1981 atgttcctaa gccgaccac ctacagcctg caggagctt gtgccatgg catgggagac
2041 ctgctcagt ccatgttca cttcagcag aagctcaact cctggcgt taccgaggag
2101 gagctggcc tcttaccgc ggtgggtctt gtctctcag accgctcgg catggagaat
2161 tccgctcgg tggagcagct ccaggagac ctgctcggg ctcttcggg tctggtgctg
2221 aagaaccggc cttggagac ttcccgttc accaagctg tctcaagct gccggacctg
2281 cggaccctga acaacatga ttccgagaag ctgctgtcct tccgggtgga cgccagtga
2341 cccgccggc cggccttctg ccgctgccc cttgtacaga atcgaactct gcacttctc
2401 ctctttacg agacgaaaag gaaaagcaaa ccagaatctt atttatattg ttataaaata
2461 ttccaagatg agcctctggc cccctgagcc ttcttgtaaa tacctgcctc cctccccat
2521 caccgaactt cccctctcc cctatttaa ccactctgtc tccccaca cctccccctg
2581 gccctctgat ttgttctgt cctgtctcaa atccaatagt tcacagctga
```

Şekil 5.2.1.1. Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (Nr1d1), mRNA; NCBI Referans numarası: NM_021724.5.

Nr1d1 geni içerisinde protein kodlama bölgesine göre (Şekil 5.2.1.1.'de arka planı renkli olarak gösterilen gen dizisi) aşağıda belirtilen ileri ve geri primerler sentezlenmiş ve proje kapsamında moleküler klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

Nr1d1 İleri primer: 5'- AgTCA gTCgAC ATg ACg ACC CTg gAC TCC AAC -3'

Kullanılan kesim enzimi: Sall (gTCgAC)

Nr1d1 Geri primer: 5'- AgTCA ggATCC TCA CTg ggC gTC CAC CCg -3'

Kullanılan kesim enzimi: BamHI (ggATCC)



Rev Erb-β protein seviyesini arttırmak amacıyla bu proteinin gen kodlama bölgesi (Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2), transcript variant 1, mRNA; NCBI Referans numarası: NM_005126.5) kullanılmıştır (Şekil 5.2.1.2.).

```

1 gtcagccgcc ctgccgccg cgggtgcgctg gctgcaggaa gccgccgcgc gccgcctttt
61 gttgtcaggg acccagcagag gaggcgcgct cgcggccgcg gccaccctc tctcgtgca
121 gcctgctgtg cgctgcacgg cctggggccc gggagccccg cccgctctgc ccatgagggg
181 gccccgcgac caccgctgct tccagcccgg ggcggcgcgg cgctgaggcg gcggcggcgg
241 cgctgcccc tctgcgggaa gcgggcggcc cggccgcgct ccgagagggc accatggagg
301 tgaatgcagg aggtgtgatt gcctatatca gttcttccag ctcagcctca agcccctcct
361 cttgtcacag tgagggttct gagaatagtt tccagtcctc ctctcttct gttccatctt
421 ctccaaatag ctctaattct gataccaatg gtaatcccaa gaatggatgat ctgccaata
481 ttgaaggcat ctgaaagaat gatcgaatag attgttctat gaaaacaagc aaatcgagtg
541 cacctgggat gacaaaaagt catagtgggtg tgacaaaatt tagtggcatg gttcactgt
601 gtaaagtctg tggggatgtg gcgtcaggat tccactatgg agttcatgct tgcgaaggct
661 gtaagggttt ctttcggaga agtattcaac aaaacatcca gtacaagaag tgcctgaaga
721 atgaaaactg ttctataatg agaatgaata ggaacagatg tcagcaatgt cgcttcaaaa
781 agtgtctgtc tgttggaaat tcaagagatg ctgttcggtt tggctgatt cctaagcgtg
841 aaaaacagag gatgctaatt gaaatgcaaa gtgcaatgaa gaccatgatg aacagccagt
901 tcagtgttca cttgcaaaat gacacattag tagaacatca tgaacagaca gccttgccag
961 cccaggaaca gctgcgacc aagcccaac tggagcaaga aaacatcaaa agctcttctc
1021 ctccatcttc tgattttgca aaggaagaag tgattggcat ggtgaccaga gttcacaagg
1081 atacctttat gtataatcaa gaggcagcaag aaaactcagc tgagagcatg cagccccaga
1141 gaggagaacg gattcccaag aacatggagc aatataatgt aaatcatgat cattcgggca
1201 atgggcttag cagccatttt cctgtagtg agagccagca gcatctcaat gaaactgtca
1261 aagggaggaa tataatgcat tacccaaatg gtcagccat ttgtattgca aatggacatt
1321 gtatgaactt ctccaatgct tatactcaaa gagtatgtga tagagttccg atagatggat
1381 tttctcagaa tgagaacaag aatagttacc tgtgcaacac tggaggaaag atgcatctgg
1441 tttgtccaat gagtaagtct ccatatgtgg atcctcataa atcaggacat gaaactgtgg
1501 aagaattttc gatgagcttc actccagcag tgaagaagt ggtggaatt gcaaagcgtg
1561 ttctgtggtt cagagatctc tctcagcatg accaggctca cttttaaag gctgggactt
1621 ttgaggtttt aatggtagcg ttccatcat tatttgatgc aaaggaactg actgtcactt
1681 ttttaagtgg aaagaaatat agtgggatg atttaccatc aatgggagca ggggatctgc
1741 taaactctat gtttgaattt agtgagaagc taaatgccct ccaacttagt gatgaagaga
1801 tgagtttgtt tacagctggt gtccctggtat ctgcagatcg atctggaata gaaaacgtca
1861 actctgtgga ggctttgcag gaaactctca ttctgtcact aaggacctta ataatgaaaa
1921 accatcaaaa tgaggcctct atttttaca aactgcttct aaagtggca gatcttcgat
1981 ctttaaaaaa catgcactct gaggagctct tggcctttaa agttcaccct taaggccttt
2041 gtttatttaa acatgaactg atggtaactg tacattttgt gctaaaatgc atatttatat
2101 gtgtatacca tatgtggaga tagaaaagac ctttaagaca ataaaagatt gtaggctatc
2161 tctgtaatca tgcaatagct gttcggattg agaactcttc agccatgatt agacgttgac
2221 tgcatctccc tgatagacca atcagctgtg tcgcacttaa actggagaag ttacactgaa
2281 gtataatcac actgaatggt agactttttc atctgcaaaa accaaaaacc attttgatct
2341 ccctgtgggt atcaatataa cgcacaatca caagtgtatg aggacttaga aattaatcct
2401 ttgtgtagg agttctgtt aatgatgaa atcttattac taccacaaga ctatttgatc
2461 tggttaattg agacttcggg atttaggaga tctccatgct tgtatttact ctaccactgc
2521 taaagtgtg ggtcctgggt agtttacttg cttgaggaaa atgagaattg atgggtccc
2581 caatgcccc cctcacagga ttactaaaa atgtctgtaa agcatattta cctcttggga
2641 gataggcact atgtaataa ggtaaaattt ctgttattac aattattcat aataatattc

```

Şekil 5.2.1.2. Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2), transcript variant 1, mRNA; NCBI Referans numarası: NM_005126.5.

Nr1d2 İleri primer: 5'- AgTCA gTCgAC ATg gAg gTg AAT gCA ggA gg -3'

Kullanılan kesim enzimi: Sall (gTCgAC)

Nr1d2Geri primer: 5'- AgTCA TCTAgA TTA Agg gTg AAC TTT AAA ggC CA -3'

Kullanılan kesim enzimi: XbaI (TCTAgA)

5.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu vasıtasıyla Nr1d1 ve Nr1d2 genlerinin çoğaltılması

Nr1d1 ve Nr1d2 genlerinin protein kodlayan bölgelerini insan DNA'sından kopyalamak için aşağıda belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hem Nr1d1 hem de Nr1d2 için hazırlanmıştır. Aşağıdaki tablolara bakıldığında PCR hesaplamaları **Tablo 5.2.2.1.**'de gösterilirken, termal döngü **Tablo 5.2.2.2.**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2.2.1. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için polimeraz zincir reaksiyonu hesaplamaları.

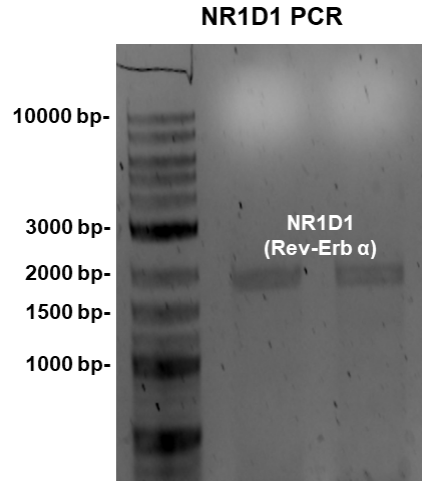
Nr1d1/ Nr1d2	Miktar
cDNA	1.0 µl
DNA polimeraz	0.2 µl
5x Buffer	4.0 µl
İleri Primer	0.4 µl
Geri Primer	0.4 µl
dNTP	0.4 µl
ACddH2O	13.6 µl
Toplam	20.0 µl

PCR reaksiyonları hazırlandıktan sonra aşağıda belirtildiği gibi termal döngü cihazında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

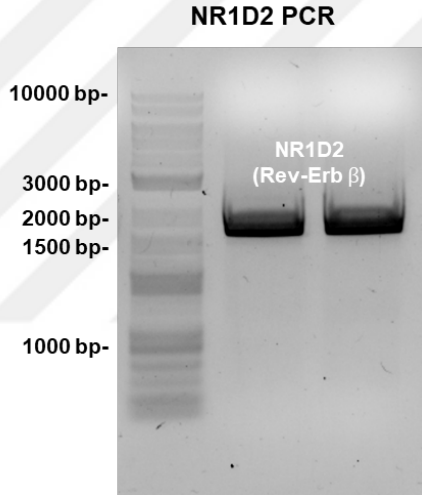
Tablo 5.2.2.2. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için polimeraz zincir reaksiyonu termal döngüsü.

Termal Döngü	Miktar	
•98°C (Başlangıç Denatürasyonu)	30 sn	
98°C (Denatürasyon)	10 sn	} x34 Döngü
68-70°C (Bağlanma)	10 sn	
72°C (Uzama)	1 dk	
72°C (Son Uzama)	2 dk	
4°C	∞	

PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen örnekler %1'lik agaroz jelde (%1 oranında RedSafe (21141, Intron)) 120W'da yürütülmüştür. PCR reaksiyonu sonrasında jel Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad) yardımıyla görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda beklenildiği gibi, Nr1d1 1845 bandında (Şekil 5.2.2.1.) gözlenirken, Nr1d2 de 1740 bandında (Şekil 5.2.2.2.) gözlemlenmiştir.



Şekil 5.2.2.1. Nr1d1 geninin PCR reaksiyonu sonrası jel görüntüsü.



Şekil 5.2.2.2. Nr1d2 geninin PCR reaksiyonu sonrası jel görüntüsü.

5.2.3. ShRev Erb- α ve ShRev Erb- β inhibisyon plazmidlerinin klonlanması

Proje kapsamında kullanılacak olan ShRev Erb- α ve ShRev Erb- β inhibisyon plazmidleri Dharmacon firmasından ticari olarak alınmıştır. İlgili plazmidler aşağıda verilmiştir.

Set of 3 SMARTvector Lentiviral Mouse Nr1d1 mEF1a-TurboRFP shRNA, glycerol set. Catalog ID: V3SM11244-10EG217166.

Kit Components:

- V3SM11241-234273745, Clone ID: V3SVMM10_14211404,
TGCCTAACTTGTCATGGGC
- V3SM11241-234939357, Clone ID: V3SVMM10_14877014
TTGCGATTGATGCGAACGA
- V3SM11241-236584144, Clone ID: V3SVMM10_16521800
TTCAGACACCGTTTGTACT

Set of 3 SMARTvector Lentiviral Mouse Nr1d2 mEF1a-TurboRFP shRNA, glycerol set. Catalog ID: V3SM11244-10EG353187.

Kit Components:

- V3SM11241-237715912, Clone ID: V3SVMM10_17653568
TTCAGAACACCATCGATGC
- V3SM11241-234624373, Clone ID: V3SVMM10_14562029
AAAGCCTCCACTGAGTTGA
- V3SM11241-235996939, Clone ID: V3SVMM10_15934598
TAGGCAATCACACCTCCTG

Proje kapsamında Rev Erb- α ve Rev Erb- β 'nın inhibisyonu için yukarıda belirtilen plazmidler kullanılmıştır. Bu nedenle proje kapsamında inhibisyon deney gruplarının kontrolü olarak SMARTvector non-targeting mEF1a-TurboRFP (Dharmacon) kullanılmıştır.

5.2.4. Nr1d1 ve Nr1d2 genleri için agaroz jelden DNA izolasyonu

Jellerin görüntüleme işlemi sonrasında Nr1d1 için 1845 baz çiftine, Nr1d2 için 1740 baz çiftine denk gelen bantlar UV lambası yardımıyla jelden kesilip kit (Zymo Clean & Gel DNA Recovery Kit, D4007, ABD) yardımıyla agaroz jelden DNA

izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısaca, kesilen jel parçası ependorf içine alınarak hassas terazide tartımı yapılmıştır. Ardından jelin ağırlığının üç katı agaroz çözücü tampon solüsyonu eklenerek 55 °C’de inkübasyonu gerçekleştirildi. Erimiş jel kitin içerisinde gelen zymo-spin kolon içerisine aktarılarak santrifüj işlemine maruz bırakıldı. Santrifüj aralarında DNA yıkama tamponu eklemeleri yapılarak jelden izole edilmiştir. En son otoklavlanmış distile su (ACddH2O) kullanılarak elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.2.5. Nr1d1 ve Nr1d2 genlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi

Nr1d1 geni için elde edilen DNA örneği ve klonlamanın yapılacağı Lenti-EF-1 α -GFP-2A-Puro Vector SalI ve BamHI kesim enzimleriyle, Nr1d2 geni için elde edilen DNA örneği ve klonlamanın yapılacağı Lenti-EF-1 α -GFP-2A-Puro Vector SalI ve XbaI kesim enzimleriyle 37°C’de kesilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi için yapılan hesaplamalar **Tablo 5.2.5.1.**’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2.5.1. Nr1d1 ve Nr1d2 genleri ile p-lenti EF1 α vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim hesaplamaları.

1- PCR ürünleri için		2- Plazmid için	
Nr1d1/Nr1d2 DNA	26 μ l	p-lenti EF1 α	5 μ l
10x Fast Digest Buffer	3 μ l	10x Fast Digest Buffer	2 μ l
BamHI/ XbaI	0,5 μ l	BamHI/ XbaI	0,5 μ l
SalI	0,5 μ l	SalI	0,5 μ l
Total	30 μl	dH ₂ O	12 μ l
		Total	20 μl

5.2.6. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünlerini saflaştırma ve konsantre hale getirme işlemi

Kesim işlemleri gerçekleştirilen örneklere kit yardımıyla DNA temizleme metodu uygulanarak kesim işleminin artıklarından uzaklaştırma ve DNA’yı

saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Bu amaçla Zymo DNA Clean and Concentrator kiti (D4003T, Zymo Research) kullanılmıştır. İşlem basamakları kısaca şu şekilde gerçekleşmiştir; vektör için iki kat, PCR örnekleri için ise beş kat bağlayıcı buffer konularak kitin içeriğindeki kolonlara bu karışım aktarıldı ve santrifüjle kolondaki filtreye bağlanması sağlandı. Ardından yıkama solüsyonu ile artıklardan tamamen arındırıldı. Son olarak elüsyon işlemi gerçekleştirilerek, IMPLEN (IMPLEN, P330, Germany) cihazında ölçümü yapıldı.

5.2.7. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünleri için ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi

Konsantrasyonu belirlenen örnekler T4 DNA ligaz (EL0014, Thermo Fisher) enzimi vasıtasıyla PCR ürünlerinin uygun kesim enzimleri ile kesilmiş olan lentiviral vektöre ligasyonu sağlanmıştır. Ligasyon işlemi için gereken hesaplamalar NebioCalculator version 1.15.0 (New England Bio Labs) sisteminden yararlanılarak yapılmıştır. Aşağıdaki şekillerde sistem üzerinde Nr1d1 ve Nr1d2 için yapılan hesaplamalar gösterilmiştir (Şekil 5.2.7.1., Şekil 5.2.7.2.).

NEBioCalculator[®] version 1.15.0

NEW ENGLAND BioLabs^{INC.} A. HOPKINS DRIVE DISCOVERY BY GENUINE

FEEDBACK ? HELP

DNA

- Ligation
- ds: Mass \leftrightarrow Moles
- ds: Mass \rightarrow Ends
- ss: Mass \leftrightarrow Moles

RNA

- ss: Mass \leftrightarrow Moles

Protein

- Mass \leftrightarrow Moles

General

- OD₂₆₀
- Dilution
- Molarity

Genome Editing

- sgRNA Designer

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Ligation | Tutorials

Insert DNA length: 1845 bp

Vector DNA length: 9517 bp

Vector DNA mass: 33 ng

Required insert DNA mass:

- 6.397 ng (1:1)
- 12.79 ng (2:1)
- 19.19 ng (3:1)
- 31.99 ng (5:1)
- 44.78 ng (7:1)

Formula

required mass insert (g) = desired insert/vector molar ratio x mass of vector (g) x ratio of insert to vector lengths

Şekil 5.2.7.1. Nr1d1 için ligasyon hesaplaması.

(<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

DNA

Ligation

ds: Mass \leftrightarrow Moles

ds: Mass \leftrightarrow Ends

ss: Mass \leftrightarrow Moles

RNA

ss: Mass \leftrightarrow Moles

Protein

Mass \leftrightarrow Moles

General

OD₂₆₀

Dilution

Molarity

Genome Editing

sgRNA Designer

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Ligation [Tutorials](#)

Insert DNA length	Required insert DNA mass
1740 bp	6.033 ng (1:1)
Vector DNA length	12.07 ng (2:1)
9517 bp	18.10 ng (3:1)
Vector DNA mass	30.17 ng (5:1)
33 ng	42.23 ng (7:1)

Formula

required mass insert (g) = desired insert:vector molar ratio x mass of vector (g) x ratio of insert to vector lengths

Şekil 5.2.7.2. Nr1d2 için ligasyon hesaplaması.

(<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)

Ligasyon işleminden sonra, bu ürünlerin kompetent hale getirilmiş bakterilerin içerisine girmesi sağlanmıştır.

5.2.8. Transformasyon işlemi için kompetent bakteri hazırlanması

Bu proje kapsamında kompetent hale getirilecek bakteriler Stb13 suşu kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, antibiyotiksiz LB agar üzerine Stb13 suşu ekilerek gece boyu 37°C’ de karıştırıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Sonraki gün çoğalan bakteri kolonilerinden bir koloni seçilerek 5 ml LB broth içerisinde gece boyu 37°C’ de inkübasyonu sağlanmıştır. Son güne gelindiğinde, 100 ml LB broth içerisine, 1 ml bakteri solüsyonundan eklenerek 3 saat boyunca 37°C’ de karıştırıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından bu LB broth önceden soğutulmuş falkon tüplere bölünmüş ve 5 dk buz üstünde inkübasyonun ardından, 4°C’ de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pellet 500 µl 100mM CaCl₂ ile çözdürülerek kompetent bakteriler elde edilmiştir.

5.2.9. Ligasyon ürünlerinin kompetent bakterilere transformasyonlarının gerçekleştirilmesi

Ligasyon işlemi gerçekleştirilen Nr1d1 ve Nr1d2 ürünlerinden 1 µl alınarak, 50 µl kompetent bakteri solüsyonuna eklenip buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından önceden ısıtılmış 42°C su banyosuna alınarak ısı-şok yöntemiyle ligasyon

ürünlerinin bakterilere transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak 250 µl LB broth içerisine alınarak 1 saat 37°C karıştırıcı inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır. Son olarak kanamisinli LB agar üzerine ekimleri gerçekleştirilerek 37°C inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra koloni çoğalan plakalardan koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

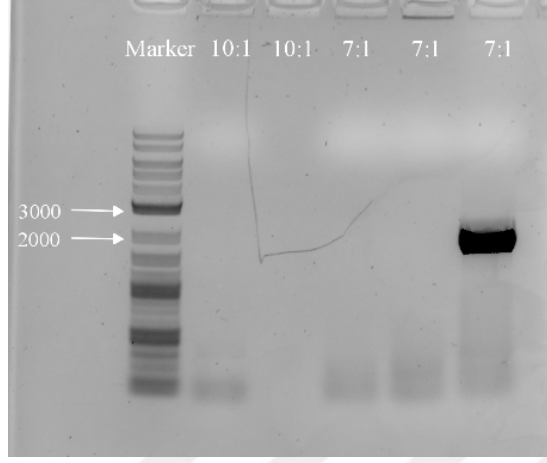
5.2.10. Transformasyon sonrası doğrulama için koloni PCR yapılması

Bu aşamada transformasyon sonrası kanamisinli plaka üzerinde çoğalan bakteri suşlarının ligasyon ürünleri olan Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerini aldıklarını doğrulamak için yapılmıştır. Kısaca, plaka üzerinden 1 adet bakteri kolonisi seçilerek 50 µl AcddH₂O içerisine pipetleme yapılarak aktarılmıştır. Koloni PCR hesaplaması **Tablo 5.2.10.1.**'de gösterilmiştir.

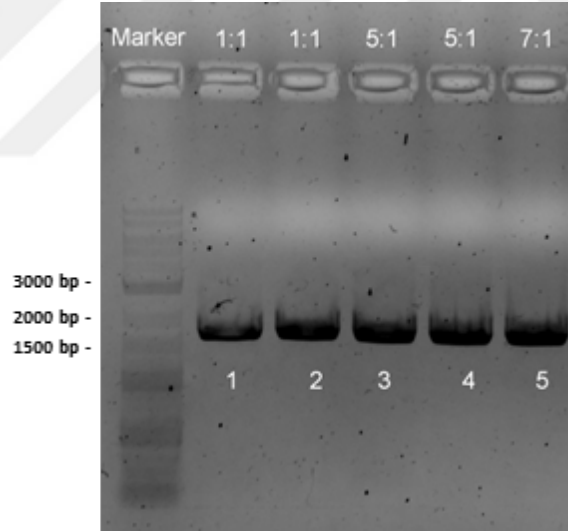
Tablo 5.2.10.1. Koloni PCR hesaplaması.

Koloni PCR	µl
cDNA (Bakteri Kolonisi)	2,5
Q5 Polymerase	0,1
5x Buffer	2
İleri Primer	0,2
Geri Primer	0,2
dNTP	0,2
ACddH ₂ O	4,8
Toplam	10 µl

Koloni PCR sonrası jel görüntüleri **Şekil 5.2.10.1.** ve **Şekil 5.2.10.2.**'de gösterilmektedir.



Şekil 5.2.10.1. Koloni PCR sonrası Nrl d1 plazmidi için jel görüntüsü.



Şekil 5.2.10.2. Koloni PCR sonrası Nrl d2 plazmidi için jel görüntüsü.

5.2.11. Transformasyon yapılan kolonilerin düşük miktarda çoğaltılması

Koloni PCR sonucu jel görüntüsü çıkan örneklerin bakteri dilüsyonları kanamisinli LB broth içerisine alınarak gece boyu 37°C'de karıştırıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Az miktarda üretim işlemi kit (ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit, D4210) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonraki güne gelindiğinde,

bakteri solüsyonu ependorflara alınarak 4°C’de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından kitin içeriğinde bulunan P1 solüsyonu ile bakteri pelleti kaldırılmıştır. Bakteri solüsyonuna lizat hale getirmek için P2 solüsyonu eklenmiş, ardından reaksiyonu durdurmak için P3 solüsyonu ilave edilmiştir. Buz üzerinde inkübasyonun ardından santrifüj edilerek süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır. Bunun üzerine bağlayıcı tampon eklenerek karıştırılmış ve vakum cihazına alınarak, plazmidlerin kolon içerisindeki filtreye tutunması sağlanmıştır. Kolona sabitlenen plazmidler son olarak elüsyon işlemiyle birlikte filtreden ayrılmaları sağlanarak üretim işlemi tamamlanmıştır.

5.2.12. Üretilen Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi

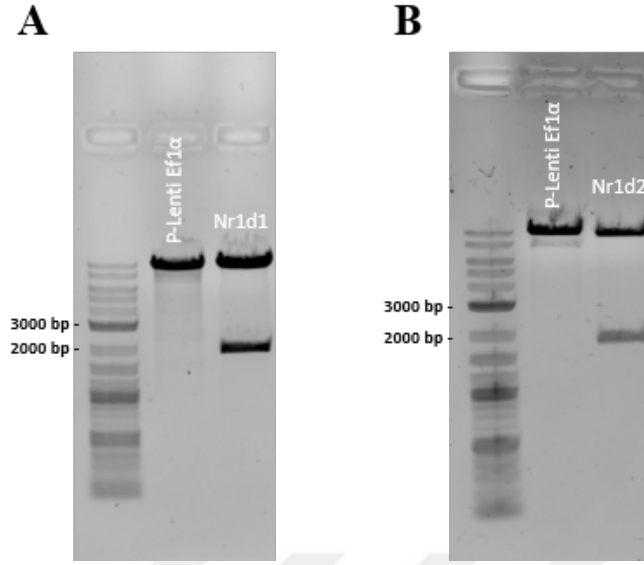
Üretilen plazmidlerin içerisindeki çoklu klonlama alanında proje dahilinde yerleştirilmek istenen gen sekanslarının olup olmadığı kontrol edebilmek için, üretilen plazmidler restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim sonucunda eğer istenilen bölgeler vektör içerisinde ise, yapılacak agaroz (%1) jel elektroforezinde birisi vektöre diğeri ise ekspresyonu artırılmak istenen gen bölgesine ait olacaktır. Kesim işlemi, Nr1d1 için BamHI ve Sall enzimleriyle yapılırken, Nr1d2 için XbaI ve Sall enzimleriyle gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak da p-lenti-Ef1 α -2A-Puro boş vektörü kullanılmıştır. Aşağıdaki **Tablo 5.2.12.1.** ve **Tablo 5.2.12.2.** ‘de deney hesaplamaları gösterilirken, **Şekil 5.2.12.1.**’de Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası, jel görüntüleri gösterilmiştir.

Tablo 5.2.12.1. Ef1 α plazmidini için restriksiyon enzimleriyle kesim hesaplamaları.

1- Ef1α için (100ng/ μl)	
P-Lenti Ef1 α	5 μl
10x Fast Digest Buffer (Green Buffer)	2 μl
BamHI/XbaI	0,5 μl
SaII	0,5 μl
AcddH ₂ O	12 μl
Total	20 μl

Tablo 5.2.12.2. Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidleri için restriksiyon enzimleriyle kesim hesaplamaları.

2- Nr1d1/d2 için	
Nr1d1/d2	10 μl
10x Fast Digest Buffer (Green Buffer)	2 μl
BamHI/XbaI	0,5 μl
SaII	0,5 μl
AcddH ₂ O	7 μl
Total	20 μl



Şekil 5.2.12.1. Nr1d1 (A) ve Nr1d2 (B) için restriksiyon enzimleriyle doğrulama aşamasındaki jel görüntüleri.

5.2.13. Kontrolü yapılan Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin kompetent bakterilere transformasyonu ve yüksek miktarda üretilmesi

Rev-Erb α ve Rev-Erb β protein seviyesini hem artırmak hem de azaltmak için yüksek miktarda virüs partikülüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle uygun gen dizilimine sahip plazmidler (Rev-Erb α için, Nr1d1 gen dizisi ve Rev-Erb β için Nr1d2 gen dizisi) bakterilere transformasyon ile aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra sadece istenilen plazmidleri içeren bakterilerin çoğalabilmesi için Lenti-Efl α -2A-Puro vektörü içerisine klonlanan örnekler (Lv-Rev Erb α , LV-Rev Erb β ve Lv-GFP) için kanamisin, Lentiviral pLVTHM vektörüne klonlanan Sh-Rev Erb α , Sh-Rev Erb β ve virüs paketleme proteinleri olan psPAX ve pMD2.G için ise ampisilin antibiyotiği kullanılmıştır. Sırasıyla, Lv-Rev Erb α , LV-Rev Erb β ve Lv-GFP (boş vektör) grupları için restriksiyon enzimleriyle kontrolü yapılan Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidleri, Sh-Rev Erb α , Sh-Rev Erb β , ScRNA (boş vektör) grupları için sipariş edilen ShRNA plazmidleri ve virüs paketleme plazmidleri (psPAX ve pMD2.G) kompetent bakterilere ısı-şok yöntemiyle aktarılmıştır. Kısaca plazmidler ile kompetent bakteriler karıştırılarak buz üzerine inkübasyona alındı ve ardından 42°C su banyosuna aniden geçirilerek bakterilerin plazmidleri almaları sağlandı. Plazmid bakteri karışımı üzerine LB broth eklenerek bir saat 37°C inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra kanamisinli LB agar üzerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün kanamisinli LB agar üzerinde çoğalan kolonilerden bir tanesi seçilip gece boyu kanamisinli LB broth içerisinde 37°C’de karıştırıcı inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır. Yüksek miktarda plazmid izolasyonu için kit (ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit, D4203) kullanılmıştır. Kısaca, yüksek miktarda üretilen bakteriler falkon tüplere alınarak, 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve bakteri pelleti kitin içeriğinde bulunan P1 solüsyonu ile çözdürüldü. Ardından P2 solüsyonu eklenerek bakteri lizatı oluşturuldu. P3 solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. Temiz bir falkon içerisine bakteri lizatından arındırma işlemi gerçekleştirilecek, bağlayıcı tamponla karıştırılıp vakum cihazına yerleştirilerek plazmidlerin süzülme esnasında kolondaki filtreye bağlanması sağlandı. Ardından yıkama işlemleri ile artıklar uzaklaştırıldı. Son olarak elüsyon işlemi ile filtrede bulunan plazmidler toplanarak yüksek miktarda plazmid elde etme işlemi tamamlandı.

5.2.14. Yüksek miktarda lentivirüs üretimi

Virüs paketlemesi için HEK293T hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin kültür ortamı (DMEM, P04-01158, Pan Biotech) %10 fetal sığır serumu (FBS; P30-1985, Pan Biotech), esansiyel olmayan amino asitler (P08-32100, Pan Biotech) ve %1 oranında stabil glutamin (Glutamax-I;35050, Gibco) içermektedir. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) çoğaltılmaktadır ve yaklaşık olarak 3 gün aralıklarla alt kültürler yapılmaktadır. Yüklü miktarda virüs üretebilmek için, yeterli sayıda T75 flaska hücre pasajı yapılarak yüksek miktarda hücre eldesi sağlanmıştır. İşlem başında hücrelerin besiyerleri atılarak, dPBS ile yıkanmış ve tripsin ile kaldırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu hücreler toplanmış ve 4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak, DMEM ile çözdürülen bu hücre solüsyonundan 10 µl alınarak hemositometrede sayım işlemi yapılmıştır. Ardından 10 cm’lik petrilere, petri başına 5,5 milyon hücre gelecek şekilde DMEM üzerine damlatma yöntemi ile ekilerek 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırılmıştır.

Sonraki gün, plazmidlerin hücrelere transfekte edilmesi kit (Lipofectamine 3000, L30000115, Thermo Fisher Scientific) protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, A ve B olmak üzere iki solüsyon hazırlanmıştır. Virüs

üretimi için gerekli moleküllerin miktarları **Tablo 5.2.14.1.**'de gösterilirken, solüsyonların içerikleri ve hesaplamaları **Tablo 5.2.14.2.** ve **Tablo 5.2.14.3.**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2.14.1. Lentivirüs üretimi için gerekli olan moleküllerin miktarları.

	Gereken miktar (ng)	Stock Sol. (ng/µl)
pMD2.G	3,5	0,5
psPAX	7	1
P-Lenti (Ef1α)	7	1
Klonlanan Plazmidler	7	1

Tablo 5.2.14.2. "A" solüsyonunun hazırlanması.

A Solüsyonu	µl
L3000 Reagent	41
Optimem	1459
Total	1500

Tablo 5.2.14.3. p-Lenti Efl α ve klonlanan plazmidler için "B" solüsyonlarının hazırlanması.

B Solüsyonu	(μl)
Klonlanan Plazmidler	
pMD2.G	7
psPAX	7
P-Lenti- Efl α NR1D1/NR1D2 Plazmidi	7
P3000	35
Optimem	1444
Toplam	1500

Transfeksiyon işlemi başında bu solüsyonlar birbirine karıştırılmış ve petrilerden aynı miktarda besiyeri çekilerek petrilerin üzerine damlatma yöntemiyle eklenmiştir. Ardından petriler 6 saat 37°C %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyonun sonunda petrideki besiyeri çekilip atılarak 10 mM HEPES içeren DMEM eklemesi yapılmıştır. Ardından 24. ve 52. saatlerde besiyeri toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan bu besiyerleri, sükröz gradiyentli tüplere aktarılarak ultrasantrifüjde yardımıyla toplanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pellet dPBS ile çözdülerek virüsler elde edilmiştir.

5.3. Deney Hayvanı Çalışmaları

5.3.1. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi

Proje kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin serebral iskemi sonrasında farelerin nörolojik durumu, enfarktüs hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliği üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla üretilen lentivirüsler (Lv-GFP, Lv-Rev-Erb α , Lv-Rev-Erb β , Lv-Rev-Erb α + Lv-Rev-Erb β ,

scRNA, sh-Rev-Erb α , sh-Rev-Erb β , sh-Rev-Erb α + sh-Rev-Erb β) serebral iskemi modelinin uygulanacağı sol hemisferde Bregma 0, lateral 2.5 mm'ye denk gelen korteks yüzey alanından 2.5 mm içeri girilerek 1.6×10^7 virüs partikülü (2 μ l 0.1 M PBS içinde) enjekte edilmiştir. Beyin içi enjeksiyonu kısaca şu şekilde yapılmıştır, fare kloral hidrat ile anesteziye alınıp sterotaksik tabla (502300, WPI, USA) üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 5.3.1.1.A). Kafatasının orta hattından kesi atılarak bregma ortaya çıkarılmıştır. Striatum koordinatlarına (bregma:0, lateral:-2.5 mm, derinlik:2.5 mm) hamilton (Hamilton, Microliter, #701) enjektörü (Şekil 5.3.1.1.B) ve mikro pompa (Micro4, WPI, USA) yardımıyla (Şekil 5.3.1.1.C) virüsler enjekte edilmiştir. Enjeksiyon 0.5 μ l/dk olacak şekilde yapılmıştır. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra hamilton iğnesi beyinden çıkarılıp 5/0 ipek dikiş ipliyle (S2165, Doğsan) dikim işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak fare kendi kafesinde istirahate alınmıştır.

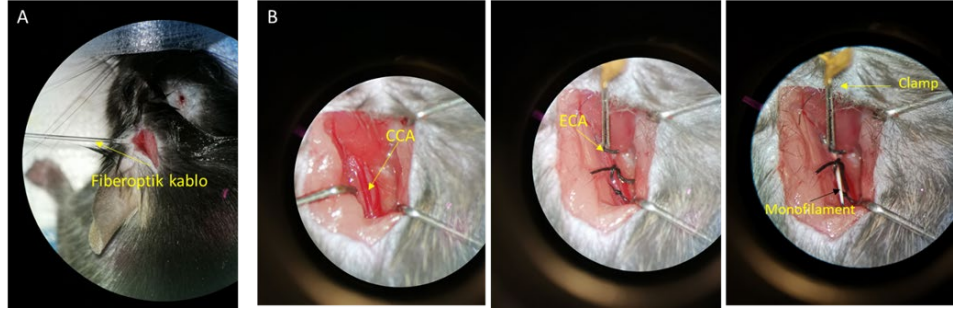


Şekil 5.3.1.1. Beyin içi enjeksiyon düzeneği.

5.3.2. Serebral iskemi modelinin uygulanması

Serebral iskemi modeli olarak, dünya genelinde en sık karşılaşılan ve deney hayvanı çalışmalarında kabul görmüş bir metot olan MCAO seçilmiştir. Gruplarına

göre (Lv-GFP, Lv-Rev-Erb α , Lv-Rev-Erb β , Lv-Rev-Erb α + Lv-Rev-Erb β , scRNA, sh-Rev-Erb α , sh-Rev-Erb β , sh-Rev-Erb α + sh-Rev-Erb β) beyin içi enjeksiyon yapılan farelere, enjeksiyondan 7 gün sonra MCAO modeli uygulanmıştır. Kısaca, 8-12 haftalık erkek 20-25 gr ağırlığındaki C57BL6/J fareler gaz anestezi sistemiyle (%1,5 izofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O)) anesteziye alınmıştır. Anlık kan akımının takibi için, kafatasında orta serebral arterin beslediği bölgenin üzerine (bregma noktası referans kabul edilerek, -2 mm posterior; 6 mm lateral) fiberoptik kablo (**Şekil 5.3.2.1.A**) yerleştirilerek lazer doppler cihazıyla (LDF) (Periflux System 5000) izlenmiştir. Operasyon süresince farelerin vücut sıcaklıklarını 36.5-37°C'de korumak için, geri bildirimli ısıtıcı sistemler kullanılmıştır (69020, ThermoStar Homeothermic Monitoring System, RWD). Operasyon, boyun bölgesine orta hattan bir kesi atılarak başlatılmış ve karotis kommunis ile karotis eksterna 6/0 ipek ipele (S1165, Doğsan) bağlanmıştır. Ardından karotis kommunis üzerine atılan bir kesi ile ucu 180-190 μ m kalınlığında silikon ile kaplı filament arterin içine sokulmuş ve bifurkasyondan itibaren direnç hissedilinceye kadar yaklaşık 9 mm orta serebral arterin girişine kadar itilmiştir (**Şekil 5.3.2.1.B**). Ardından LDF üzerinden kan akımının %80-85 oranında düştüğü gözlemlendikten sonra orta serebral arterin tıkalı kalacağı süre olan 90 dk boyunca orada kalmıştır. Sonrasında filament geri çekilerek reperfüzyonun gerçekleşmesine izin verilmiştir. Son olarak filament çıkarılmış, farenin hem boyun hem de kafa derisi 5/0 ipek ipele (S2165, Doğsan) dikilerek kafesine alınmıştır. Farelerin sakrifikasyonu, operasyonu takiben 24 saat reperfüzyon sonrasında nörolojik skorlamaları alınmasının hemen ardından izofluran ile derin anestezi altında dekapitasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Ardından beyin disekte edilerek kuru buz üzerinde dondurulmuş ve soğuk alan mikrotomunda (cryostat, CM1950, Leica) kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.3.2.1. Fiber optik kablonun takılması (A) ve MCAO operasyonunun gerçekleştirilmesi (B).

5.3.3. Nörolojik skora

Serebral iskemi modeli uygulanan fareler 24 saat reperfüzyonun ardından sakrifiye edilmeden hemen önce nörolojik skorları alınmıştır. Nörolojik skora aşağıda verilen yönergeler doğrultusunda alınmıştır [313].

0= Herhangi bir nörolojik kısıtlama görülüyorsa

1= Ön ayağını çekiyorsa

2= Ön ayağını çekiyorsa ve harekette direnç gösteriyorsa

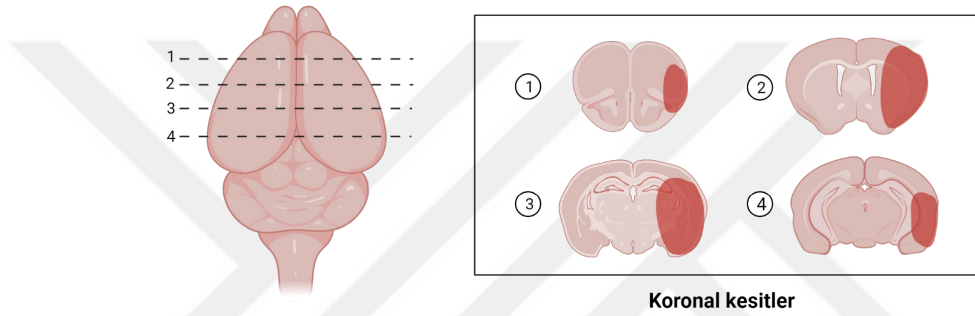
3= Daire çizerek hareket ediyorsa

4= Sürekli daireler çizip kranial-kaudal aks doğrultusunda dönmesi

5= Herhangi bir hareket gözlemlenmiyorsa

5.4. Cryostat Cihazı Kullanılarak Beyinlerin Kesilmesi

Kuru buz üzerinde dondurulan beyinlerin kesimi cryostat cihazı (CM1950, Leica) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Kesitler, beynin ön tarafından başlayarak 2 mm aralıklarla, her kesit 20 µm olacak şekilde alınmıştır (Şekil 5.4.1.). Pozitif yüklü camlar üzerine alınan bu kesitler sıcaklığı 40°C olan ısıtıcı tabla üzerinde 30 dk bekletilerek dokuların cama iyice sabitlenmesi sağlanmıştır. Fare beyinlerinin kesimi esnasında striatum seviyesinden doku örnekleri alınarak moleküler analiz yöntemleri için ayrılmıştır.



Şekil 5.4.1. Beyinden alınan koronal kesitlerin bölgeleri.

5.5. Enfarktüs Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi

Cryostat cihazı kullanılarak 2 mm aralıklarla alınan kesitlere cresyl violet (C5042, Cresyl Violet Acetate, Sigma) boyaması yapılmıştır [314, 315]. Bu protokolda endoplazmik retikulum üzerinde bulunan nissl cisimcikleri mavi-mor şekilde boyanmaktadır. Ölü olan doku bölgelerinde ise herhangi bir renk değişimi görülmemektedir. Bu farktan yola çıkarak enfarktüs hacmi ve beyin ödemi Image J programı (National Institute of Health) kullanılarak enfarktüs hacmi ve beyin ödemi hesaplanmıştır [11, 315].

5.6. Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi

KBB geçirgenliğinin analizi için immunglobulin G (IgG) boyaması yapılmıştır. Bu projede kullanılan 90 dakikalık MCAO modeli beyinde ağır bir hasara sebep olduğundan KBB'ye hasar vermektedir [316]. Bu amaçla, IgG boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent, R.T.U.(pk-7100, Vector Laboratories) kiti

kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatları ve literatürde yer alan makalelerimizdeki protokoller uygulanarak boyama işlemleri yapılmıştır [314, 315]. Boyama sonunda elde edilen örnekler tarayıcıda taratılmış ve KBB geçirgenliği Image J programı (National Institute of Health) ile analiz edilerek KBB geçirgenliğindeki bozulma oranı hesaplanmıştır [315].

5.7. Proteomik Analizler

Proteomik analizler, her gruptaki hayvanların iskemik hemisferlerinden örnekler alınarak, İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) bünyesinde bulunan proteomiks laboratuvarındaki SYNAPTQ2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfı cihazı (Waters) kullanılarak yapılmıştır. Proteomiks cihazı ile alakalı Beker ve ark. ve Yalçın ve ark.'nın yaptığı çalışmalardan yararlanılmıştır [11, 315]. Kısaca, yapılacak işlem proteomiks hücre pelletleri veya dokudan elde edilmiş toplam protein karışımının ön ayırım yapılmaksızın tripsin enzimi ile parçalanarak peptit yapısında incelenmesine dayanmaktadır. Protein tanımlaması işlemi; tanımlanan peptitlerden bütün olan protein yönünde olduğu için tüme-varımsal (bottom-up) proteomiks olarak tarif edilmektedir. Bu yöntem vasıtasıyla kısmi sekanslar üzerinden protein tanımlama işlemi gerçekleştirilmektedir.

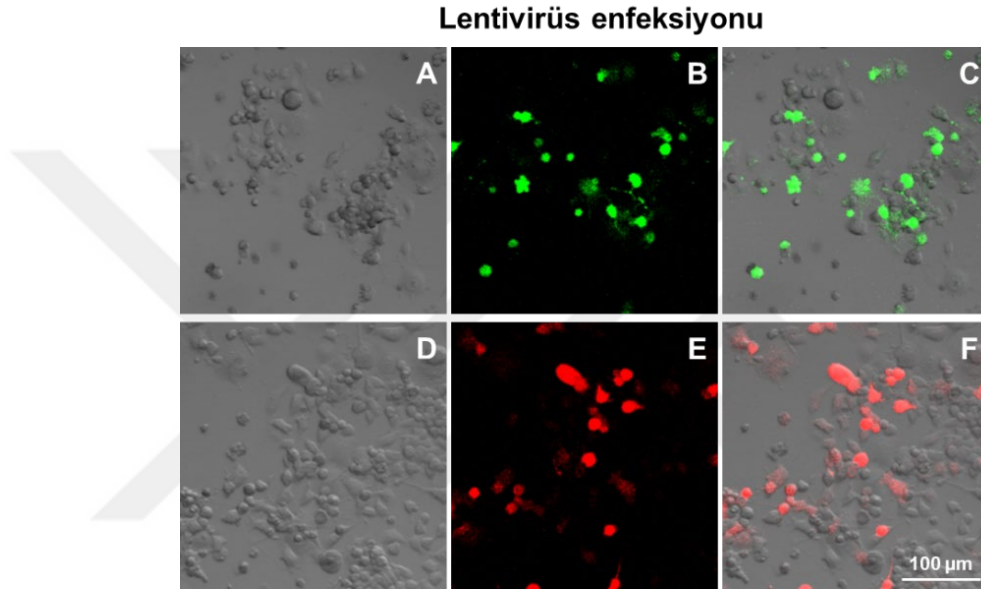
5.8. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α/β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α/β) farklılıkların belirlenmesi ve LC-MS/MS verileri için istatistiksel analizler SPSS programı (Ibm) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar SPSS programındaki tek yönlü (one-way) varyans analizi (Analysis of varitaion, ANOVA) kullanılarak, post-hoc testinde en düşük anlamlı farklılık testiyle (least significant difference, LSD test) analiz edilmiştir. Bütün değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş, *p<0,05 ve **p<0,01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir [314, 317].

6. BULGULAR

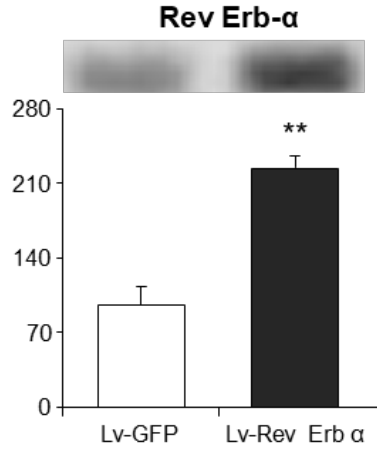
6.1. Lentivirüslerle Hücrelerin Enfekte Edilmesi

Elde edilen virüslerin hücreleri enfekte ettiklerini gösterebilmek için fare N2A hücre hattı kullanılmıştır. Lentiviral uygulama sonrasında, fare N2A hücre hatlarının başarılı bir şekilde enfekte olduğu görülmüştür (Şekil 6.1.1.).

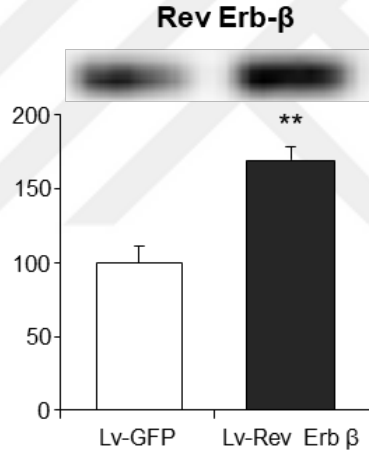


Şekil 6.1.1. Lentivirüs enfeksiyon verimliliği. Yeşil floresan proteine (Green Fluorescent Protein; GFP) sahip olan Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β ve Lv-RevErb α/β (A, B, C) başarılı bir şekilde fare N2A hücrelerini enfekte etmiştir. Ayrıca kırmızı floresan proteine (Red Fluorescent Protein; RFP) sahip olan scRNA ShRevErb α , ShRevErb β ve ShRevErb α/β 'nın (D, E, F) da etkili bir şekilde fare N2A hücrelerini enfekte ettiği görülmüştür.

Moleküler klonlamalar neticesinde elde edilen Lv-RevErb α ve Lv-RevErb β plazmidlerinin RevErb α ve RevErb β protein seviyelerini arttırıp arttırmadığını belirlemek amacıyla hücrelerden elde edilen protein örneklerinden RevErb α ve RevErb β protein seviyeleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 6.1.2., Şekil 6.1.3.).



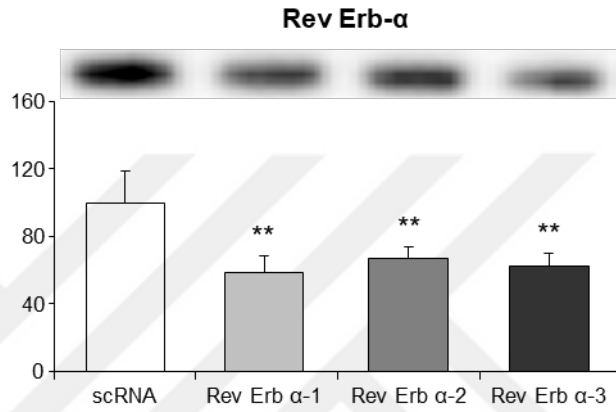
Şekil 6.1.2. Lv-Rev Erb- α plazmidinin Rev-Erb- α protein seviyesi üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı (independent samples t test) göstermektedir.



Şekil 6.1.3. Lv-Rev Erb- β plazmidinin Rev-Erb- β protein seviyesi üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı (independent samples t test) göstermektedir.

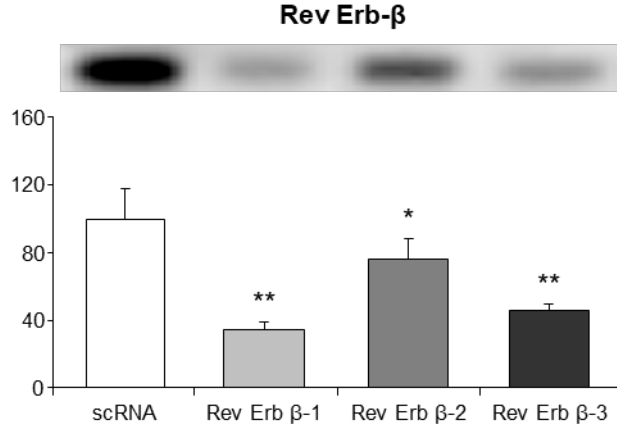
Lv-RevErb α plazmidinin RevErb α protein seviyesini 2.2 kat, Lv-RevErb β plazmidinin ise RevErb β protein seviyesini yaklaşık 1.7 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.01$).

RevErb α ve RevErb β protein ifadelerini baskılamak amacıyla satın alınan ticari kitte her bir gen için üç farklı plazmid bulunmaktadır. Bu plazmidlerden hangisinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde RevErb α veya RevErb β protein seviyesini baskıladığı araştırılmıştır. En yüksek verimliliğe sahip plazmidleri seçmek amacıyla N2A hücrelerine transfeksiyon işlemi sonrasında bu hücreler toplanmış ve Western blot tekniği kullanılarak bu hücrelerden RevErb α ve RevErb β protein seviyeleri analiz edilmiştir (Şekil 6.1.4., Şekil 6.1.5.).



Şekil 6.1.4. Rev-Erb α inhibisyon plazmidlerinin Rev-Erb α protein seviyesi üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. **p<0.01 scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Üçlü gliserol stok içerisinde gelen RevErb α 'ya spesifik shRNA plazmidleri RevErb α -1, RevErb α -2 ve RevErb α -3 olarak isimlendirilmiştir. Bu plazmidlerden elde edilen virüsler fare N2A hücrelerine uygulandıktan sonra enfekte olan hücrelerden RevErb α protein seviyesi Western blot tekniğiyle hesaplanmıştır. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde üç plazmidinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede (p<0.01) RevErb α seviyesini baskıladığı gözlemlenmiştir. Fakat en fazla düşüş RevErb α -1 plazmid grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiler dahilinde projenin geri kalan tüm kısımlarında RevErb α -1 plazmidini RevErb α inhibisyonu için kullanılmıştır.



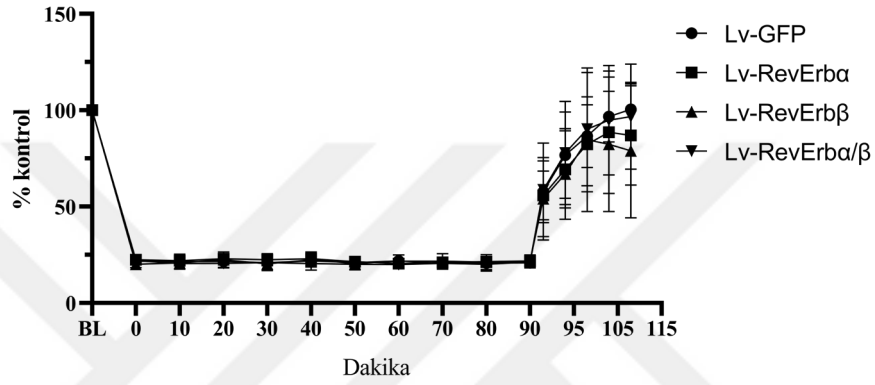
Şekil 6.1.5. Rev-Erb β inhibisyon plazmidlerinin Rev-Erb β protein seviyesi üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ /
* $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Üçlü gliserol stok içerisinde gelen Rev-Erb- β 'ya spesifik shRNA plazmidleri RevErb β -1, RevErb β -2 ve RevErb β -3 olarak isimlendirilmiştir. Bu plazmidlerden elde edilen virüsler fare N2A hücresine uygulandıktan sonra enfekte olan hücrelerden RevErb β protein seviyesi Western blot tekniğiyle hesaplanmıştır. Her üç plazmidin de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.01$ / $p < 0.05$) azalttığı gözlemlenmiştir. Fakat RevErb β -1 olarak isimlendirilen plazmidin diğer plazmidlere göre daha fazla RevErb β protein seviyesini baskıladığı görülmüştür. Bu bilgiler dahilinde projenin geri kalan tüm kısımlarında RevErb β -1 plazmidini RevErb β inhibisyonu için kullanılmıştır.

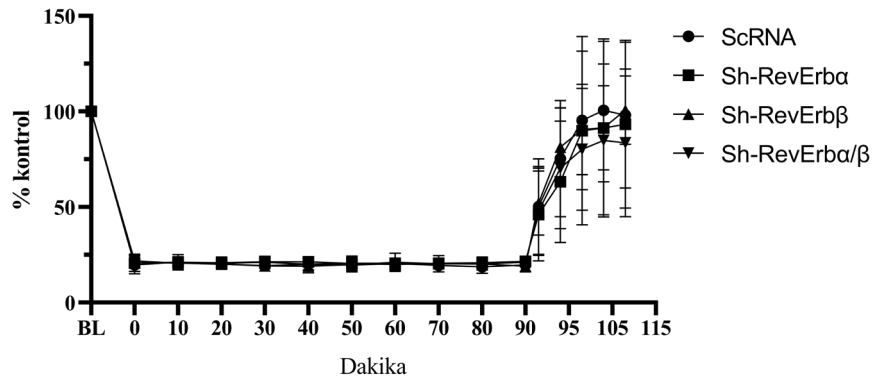
6.2. Laser Doppler Akışmetre

Akut iskemi modelinin istenilen süreler içerisinde olduğunu ve operasyon sonrasında reperfüzyon aşamasını göstermek amacıyla farelerin kafasına yerleştirilen fiberoptik kablo ile laser doppler akışmetre sistemi kullanılarak beyin akımı anlık olarak izlenmiştir.

Laser Doppler Akışmetre



Laser Doppler Akışmetre



Şekil 6.2.1. Laser doppler akışmetre. (A) RevErb α/β protein ifadesi artırılmış deney seti, (B) RevErb α/β protein ifadesi baskılanmış deney setinin laser doppler akışmetre sonuçlarını göstermektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.

Farelerin beyin kan akımları analiz edildiğinde, hem RevErb α/β protein ifadesi artırılmış (**Şekil 6.2.1.A**) hem de baskılanmış (**Şekil 6.2.1.B**) gruplarda, MCA'nın girişinin monofilament ile kapatılmasının ardından, beyin kan akımının normal değerinden ~%80 oranında düştüğü ve iskemi modelinin indüklendiği görülmektedir. Ayrıca her iki grupta da monofilament 90 dakikanın sonunda geri çekildiğinde beyin kan akımının arttığı izlenmektedir. Hem RevErb α/β protein ifadesi artırılmış (**Şekil 6.2.1.A**) hem de baskılanmış (**Şekil 6.2.1.B**) gruplarda reperfüzyon değerlerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir değişim görülmemiştir.

6.3. Nörolojik Skorlama

Doksan dakika MCAO modeli uygulanan fareler 24 saat reperfüzyonun ardından sakrifiye edilmeden hemen önce nörolojik skorları alınmıştır. Nörolojik skorlama Bederson testine göre değerlendirilmiştir. Bu testte hayvanların nörolojik durumlarına göre sıfırdan beşe kadar değişen puanlamalar bulunmaktadır [313].

0= Herhangi bir nörolojik kısıtlama görülüyorsa

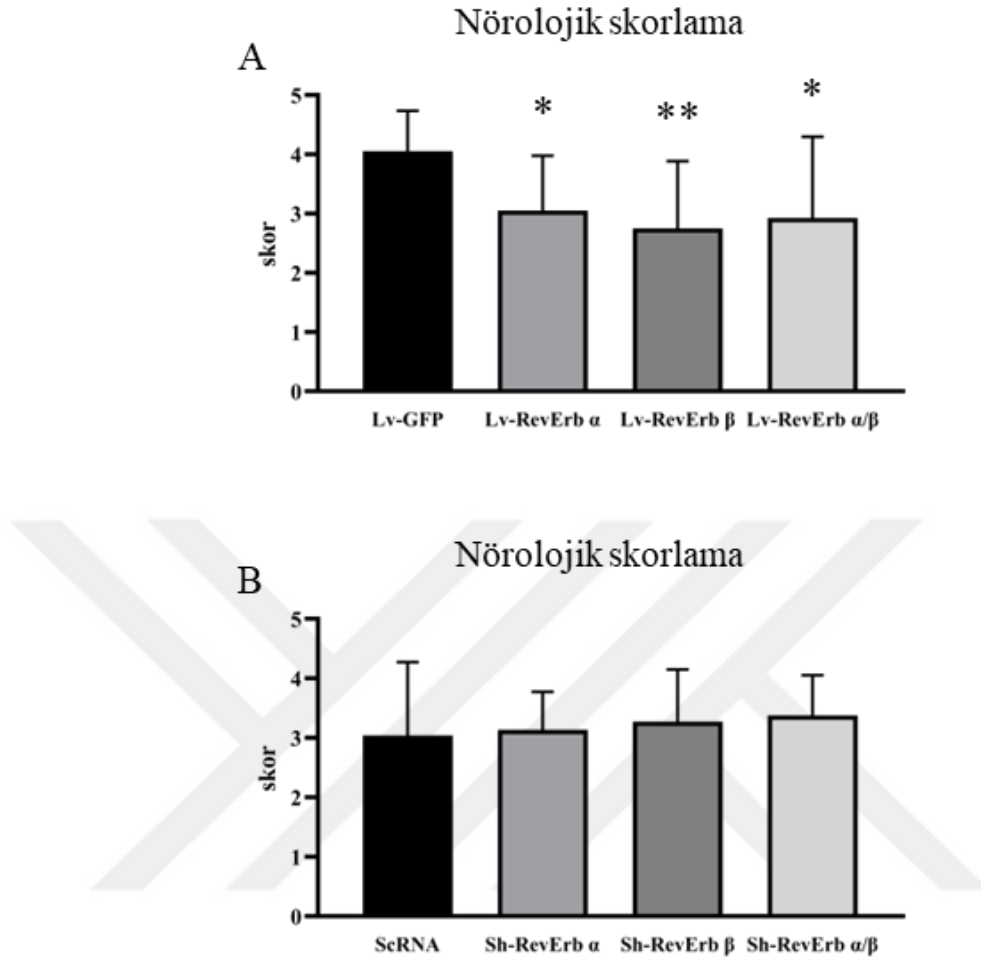
1= Ön ayağını çekiyorsa

2= Ön ayağını çekiyorsa ve harekette direnç gösteriyorsa

3= Daire çizerek hareket ediyorsa

4= Sürekli daireler çizip kranial-kaudal aks doğrultusunda dönmesi

5= Herhangi bir hareket gözlemlenmiyorsa



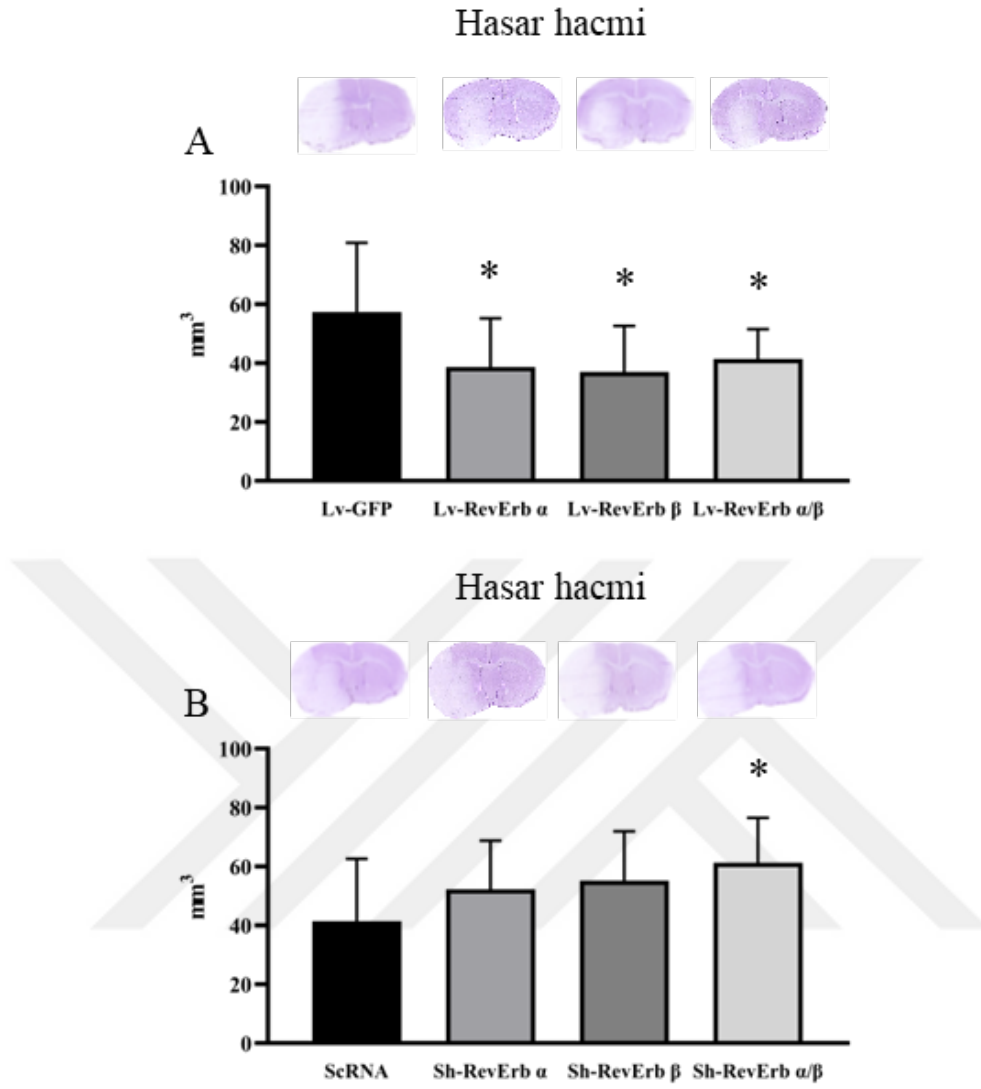
Şekil 6.3.1. Nörolojik skörlama testi. (A) Rev Erb α/β protein ifadesi arttırılmış deney seti, (B) Rev Erb α/β protein ifadesi baskılanmış deney setinin nörolojik skörlama sonuçlarını göstermektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Serebral iskemi modelinden 24 saat sonra alınan skörlamalar neticesinde Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β uygulanan gruplardaki farelerin nörolojik durumlarının Lv-GFP uygulanan farelerin nörolojik durumlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.01$ veya $p < 0.05$) daha iyi olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 6.3.1.A**). Protein ifadesinin baskılandığı gruplarda yapılan nörolojik skörlamalarda ise farelerin nörolojik durumlarının birbirine çok yakın olduğu ve istatistiksel olarak herhangi bir farklılığın olmadığı görülmüştür (**Şekil 6.3.1.B**).

6.4. Hasar Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi

Serebral iskemi modeli sonrasında sakrifiye edilen farelerin beyinleri kur buz üzerinde dondurulmuştur. Ardından cryostat cihazı kullanılarak 2 mm aralıklarla alınan kesitlere cresyl violet boyaması yapılmıştır [314, 315]. Bu protokolde endoplazmik retikulum üzerinde bulunan nissl cisimcikleri mavi-mor şekilde boyanmaktadır. Ölü olan doku bölgelerinde ise herhangi bir renk değişimi görülmemektedir. Bu farktan yola çıkarak hasar hacmi ve beyin ödemi Image J programı (National Institute of Health) kullanılarak enfarktüs hacmi ve beyin ödemi hesaplanmıştır [11, 315].

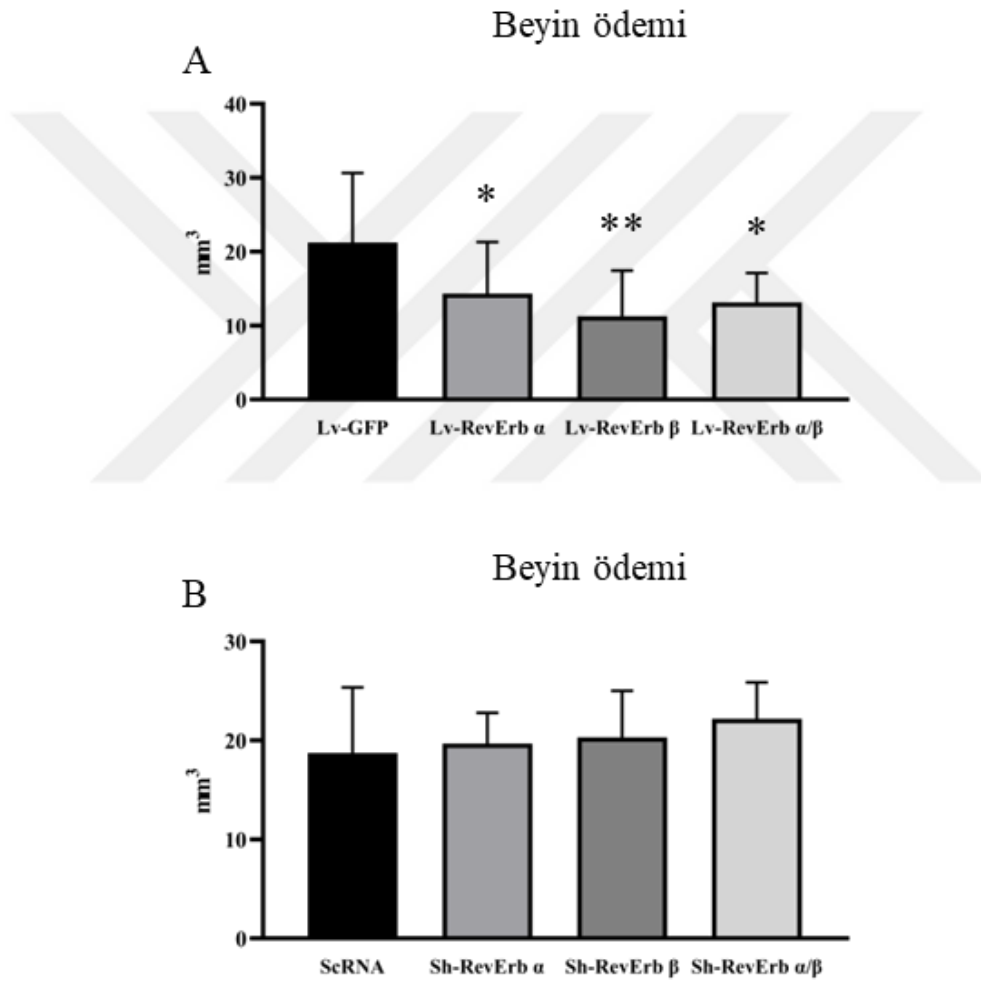




Şekil 6.4.1. Beyin hasar hacmi analizi. (A) Rev Erb α/β protein ifadesi artırılmış deney setinin, (B) Rev Erb α/β protein ifadesi baskılanmış deney setinin hasar hacmini göstermektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. (A) için $*p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. (B) için $*p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

RevErb α/β 'nın protein ifadesinin artırımı amacıyla oluşturulan gruplar analiz edildiğinde (Şekil 6.4.1.A) hem Lv-RevErb α 'nın hem de Lv-RevErb β 'nin Lv-GFP grubuna kıyasla hasar hacmini istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) seviyede azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, her iki virüsün uygulanarak elde edildiği Lv-RevErb α/β grubundaki hasar hacmi de Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

($p < 0.05$) seviyede azalmış olduğu görülmüştür. RevErb α/β protein ifadesini baskılamak amacıyla oluşturulan gruplar analiz edildiğinde (Şekil 6.4.1.B) Sh-RevErb α ve Sh-RevErb β uygulanan gruplardaki hasar hacminin arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. Son olarak ise hem RevErb α hem de RevErb β 'nin inhibe edildiği grup analiz edildiğinde ise hasar hacminin scRNA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$) artmış olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 6.4.2. Beyin ödem analizi. (A) RevErb α/β protein ifadesi artırılmış deney setinin, (B) RevErb α/β protein ifadesi baskılanmış deney setinin beyin ödemi göstermektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. (A) için ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı

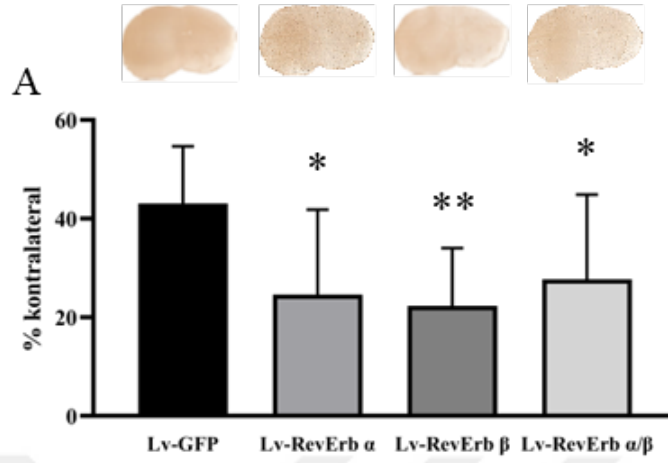
göstermektedir. (B) için * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırımı amacıyla oluşturulan gruplarındaki beyin ödemi analiz edildiğinde (Şekil 6.4.2.A) Lv-RevErb α ve Lv-RevErb α/β gruplarındaki beyin ödemi $p < 0.05$ olacak şekilde, Lv-RevErb β grubunda ise $p < 0.01$ olacak şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. RevErb α/β 'nin protein ifadesini baskılamak amacıyla oluşturulan gruplar analiz edildiğinde (Şekil 6.4.2.B) Sh-RevErb β ve Sh-RevErb α/β gruplarındaki beyin ödeminin scRNA grubuna kıyasla artmış bir bir trende girdiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($p < 0.05$) olmadığı görülmüştür.

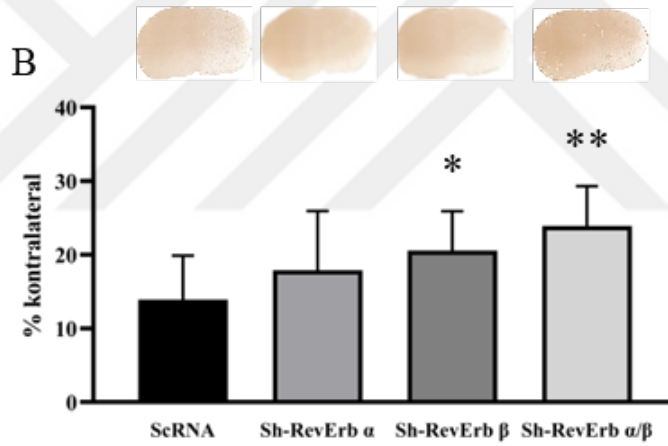
6.5. Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi

Kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğinin analizi için immunglobulin G (IgG) boyaması yapılmıştır. Bu projede kullanılan 90 dakikalık MCAO modeli beyinde ağır bir hasara sebep olduğundan kan beyin bariyerine hasar vermektedir [316]. Bu amaçla, IgG boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent, R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories) kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatları ve literatürde yer alan makalelerimizdeki protokoller uygulanarak boyama işlemleri yapılmıştır [314, 315]. Boyama sonunda elde edilen örnekler tarayıcıda taratılmış ve KBB geçirgenliği Image J programı (National Institute of Health) ile analiz edilerek KBB geçirgenliğindeki bozulma oranı hesaplanmıştır [315].

Kan Beyin bariyeri geçirgenliği



Kan Beyin bariyeri geçirgenliği



Şekil 6.5.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin analizi. (A) RevErb α/β protein ifadesi artırılmış deney setinin, (B) RevErb α/β protein ifadesi baskılanmış deney setinin kan-beyin bariyerindeki ortalama bozulmayı göstermektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. (A) için ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. (B) için * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

RevErb α/β 'nın protein ifadesinin artırımı için dizayn edilmiş gruplar incelendiğinde Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β uygulanan gruplardaki farelerin KBB bütünlüğü Lv-GFP uygulanan farelerin KBB bütünlüğüne

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0.01$ veya $p<0.05$) daha iyi olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 6.5.1.A**). RevErb α/β 'nın protein ifadesinin baskılanması amacıyla oluşturulan deney seti incelendiğinde Sh-RevErb β ve Sh-RevErb α/β gruplarına bakıldığında scRNA grubu ile kıyaslandığında KBB geçirgenliğinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0.05$) arttığı tespit edilmiştir. Ek olarak, Sh-RevErb α grubunda da KBB geçirgenliğinin arttığını fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür (**Şekil 6.5.1.B**).

6.6. Proteomik Analizler

Proteomik analizler, her gruptaki hayvanların iskemik hemisferlerinden örnekler alınarak, İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) bünyesinde bulunan proteomiks laboratuvarındaki SYNAPTIG2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfı cihazı (Waters) kullanılarak yapılmıştır. Proteomiks cihazı ile alakalı Beker ve ark. ve Yalçın ve ark.'nın yaptığı çalışmalardan yararlanılmıştır [11, 318]. Uygulanan proteomiks yöntemi, hücre pelletleri veya dokudan elde edilmiş toplam protein karışımının ön ayırımı yapılmaksızın tripsin enzimi ile parçalanarak peptit yapısında incelenmesine dayanmaktadır. Protein tanımlama işlemi; tanımlanan peptitlerden bütün olan protein yönünde olduğu için tüme-varımsal (bottom-up) proteomiks olarak tarif edilmektedir. Bu yöntem vasıtasıyla kısmi sekanslar üzerinden protein tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırıldığı gruplar (Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α/β) ve vektör olan Lv-GFP grubunun analizi aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplamda 2170 protein tanımlanmıştır ve tabloda, 2 kat değişim ve 0,5 kat ve altına inen proteinler gösterilmiştir. Bu şekilde 291 tane protein tanımlanmıştır (**Tablo 6.6.1.-8**).

Tablo 6.6.1. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-1.

Kod	İsim	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
Q6ZPJ3	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2O	Light Blue	Light Red	Red
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha	Light Blue	Light Red	Light Red
P58871	182 kDa tankyrase-1-binding protein	Light Blue	Light Red	Red
P16330	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	Light Blue	Light Red	Light Red
P62334	26S proteasome regulatory subunit 10B	Light Blue	Light Red	Light Red
Q99L13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Light Blue	Light Red	Light Red
P62301	40S ribosomal protein S13	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9CZX8	40S ribosomal protein S19	Light Blue	Light Red	Light Red
P61922	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	Light Blue	Light Red	Light Red
P27659	60S ribosomal protein L3	Light Blue	Light Red	Light Red
P62918	60S ribosomal protein L8	Light Blue	Light Red	Light Red
Q8CBW3	Abl interactor 1	Light Blue	Light Red	Light Red
Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Light Blue	Light Red	Light Red
O35381	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9CVB6	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9JM76	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	Light Blue	Light Red	Light Red
Q99JY9	Actin-related protein 3	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	Light Blue	Light Red	Light Red
P48962	ADP/ATP translocase 1	Light Blue	Light Red	Light Red
P51881	ADP/ATP translocase 2	Light Blue	Light Red	Light Red
P61205	ADP-ribosylation factor 3	Light Blue	Light Red	Light Red
Q8CG76	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9WTQ5	A-kinase anchor protein 12	Light Blue	Light Red	Light Red
E9Q394	A-kinase anchor protein 13	Light Blue	Light Red	Light Red
Q8BGQ7	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	Light Blue	Light Red	Light Red
P07724	Albumin	Light Blue	Light Red	Light Red
Q91VB8	Alpha globin 1	Light Blue	Light Red	Light Red
Q60590	Alpha-1-acid glycoprotein 1	Light Blue	Light Red	Light Red
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	Light Blue	Light Red	Light Red
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	Light Blue	Light Red	Light Red
Q61247	Alpha-2-antiplasmin	Light Blue	Light Red	Light Red
O88990	Alpha-actinin-3	Light Blue	Light Red	Light Red
P57780	Alpha-actinin-4	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9CQX8	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase component 4	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9DB05	Alpha-soluble NSF attachment protein	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9QXJ1	Amyloid beta precursor protein binding family B member 1	Light Blue	Light Red	Light Red
A0A2I3BPT1	Amyloid-beta A4 protein	Light Blue	Light Red	Light Red
Q9WVH6	Angiopoietin-4	Light Blue	Light Red	Light Red
G5E893	Ankyrin repeat domain 12	Light Blue	Light Red	Light Red

Tablo 6.6.2. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-2.

Kod	İsmi	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
Q99NH0	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	Light	Dark	Light
P62743	AP-2 complex subunit sigma	Light	Dark	Dark
Q00623	Apolipoprotein A-I	Light	Dark	Light
Q9Z0X1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	Light	Light	Dark
Q68FF6	ARF GTPase-activating protein GIT1	Light	Dark	Dark
Q8VHH5	CRAM-associated GTPase (CRAG)	Light	Dark	Dark
Q8BP47	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	Light	Dark	Dark
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Light	Dark	Dark
Q9Z2W0	Aspartyl aminopeptidase	Light	Light	Dark
Q9Z2H5	Band 4.1-like protein 1	Light	Light	Light
P21550	Beta-enolase	Light	Light	Dark
Q9CWJ9	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	Light	Dark	Dark
B2RQC6	CAD protein	Light	Dark	Dark
Q9WTR5	Cadherin-13	Light	Light	Dark
A2ALL9	Calcium-transporting ATPase	Light	Light	Dark
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	Light	Dark	Dark
Q9EPL2	Calsyntenin-1	Light	Light	Dark
Q9DBC7	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	Light	Dark	Dark
A0A1B0GRG8	Carbonyl reductase (NADPH)	Dark	Dark	Light
O89001	Carboxypeptidase D	Light	Light	Dark
Q6P9K8	Caskin-1	Light	Dark	Dark
P26231	Catenin alpha-1	Light	Light	Dark
Q5M8N0	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	Light	Dark	Dark
Q8BLQ9	Cell adhesion molecule 2	Light	Dark	Dark
A2AL36	Centriolin	Light	Light	Dark
Q80U49	Centrosomal protein of 170 kDa protein B	Light	Dark	Dark
E9Q309	Centrosome-associated protein 350	Light	Dark	Dark
A3KGJ7	Centrosome-associated protein CEP250	Light	Dark	Dark
F6XLV1	Ciliary rootlet coiled-coil protein 2	Light	Light	Dark
Q6AW69	Cingulin-like protein 1	Light	Light	Dark
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Light	Dark	Dark
Q8BRT1	CLIP-associating protein 2	Light	Light	Dark
Q0VG85	Coiled-coil domain-containing protein 162	Light	Light	Dark
A0A1L1ST15	Coiled-coil domain-containing protein 162	Light	Dark	Dark
Q63ZW6	Col4a5 protein	Light	Light	Dark
P28481	Collagen alpha-1(II) chain	Light	Light	Dark
Q9JLI2	Collagen type V alpha 3 chain	Light	Light	Dark
B8JJN0	Complement factor B	Light	Dark	Dark
Q8JZN5	Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial	Light	Dark	Dark
Q61330	Contactin-2	Light	Light	Dark

Tablo 6.6.3. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-3.

Kod	İsmi	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
O54991	Contactin-associated protein 1	Light	Light	Light
Q8BLR2	Copine-4	Light	Light	Light
Q1RLL3	Copine-9	Light	Light	Light
P49615	Cyclin-dependent kinase 5	Light	Light	Light
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Light	Light	Light
Q9CQ69	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Light	Light	Light
O88485	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1	Light	Light	Light
Q8BMK4	Cytoskeleton-associated protein 4	Light	Light	Light
Q9WV69	Dematin	Light	Light	Light
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1	Light	Light	Light
B2RQ71	Dip2c protein	Light	Light	Light
Q9Z218	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6	Light	Light	Light
Q9R1V6	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22	Light	Light	Light
Q9R1V7	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23	Light	Light	Light
P70175	Disks large homolog 3	Light	Light	Light
Q62108	Disks large homolog 4	Light	Light	Light
P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Light	Light	Light
Q8BL66	Early endosome antigen 1	Light	Light	Light
Q9QXX4	Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A13, mitochondrial	Light	Light	Light
Q921G7	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Light	Light	Light
P57776	Elongation factor 1-delta	Light	Light	Light
Q3UJB9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	Light	Light	Light
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Light	Light	Light
Q91W69	Epsin-3	Light	Light	Light
Q6NZJ6	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Light	Light	Light
Q9WUK2	Eukaryotic translation initiation factor 4H	Light	Light	Light
P56564	Excitatory amino acid transporter 1	Light	Light	Light
P43006	Excitatory amino acid transporter 2	Light	Light	Light
P29391	Ferritin light chain 1	Light	Light	Light
Q8K0E8	Fibrinogen beta chain	Light	Light	Light
Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain	Light	Light	Light
Q8BTM8	Filamin-A	Light	Light	Light
Q61572	Forkhead box protein C1	Light	Light	Light
F8VQ05	FRY-like transcription coactivator	Light	Light	Light
Q8VDC1	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	Light	Light	Light
P22723	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2	Light	Light	Light
P60521	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	Light	Light	Light
O88741	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	Light	Light	Light
O08795	Glucosidase 2 subunit beta	Light	Light	Light
P48318	Glutamate decarboxylase 1	Light	Light	Light

Tablo 6.6.4. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-4.

Kod	İsmi	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
Q99JP7	Glutathione hydrolase 7	Light Blue	Blue	Dark Blue
P48774	Glutathione S-transferase Mu 5	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q3ULJ0	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q8BGN3	Glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase ENPP6	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q8CI94	Glycogen phosphorylase, brain form	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q3THK7	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q91VW5	Golgin subfamily A member 4	Light Blue	Blue	Dark Blue
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Light Blue	Blue	Dark Blue
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q91X72	Hemopexin	Light Blue	Blue	Dark Blue
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q9Z2X1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Light Blue	Blue	Dark Blue
O08528	Hexokinase-2	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q8BGZ1	Hippocalcin-like protein 4	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q6PG16	Holliday junction recognition protein	Light Blue	Blue	Dark Blue
O35085	Homeobox protein ARX	Light Blue	Blue	Dark Blue
P00493	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Light Blue	Blue	Dark Blue
P01868	Ig gamma-1 chain C region secreted form	Light Blue	Blue	Dark Blue
F6TQW2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q6NXX7	Inactive dipeptidyl peptidase 10	Light Blue	Blue	Dark Blue
P49442	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q61703	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q3TW14	Interferon regulatory factor 7	Light Blue	Blue	Dark Blue
O88844	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q9QXL2	Kinesin-like protein KIF21A	Light Blue	Blue	Dark Blue
D3YXS5	Kinesin-like protein KIF28	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q9CPU0	Lactoylglutathione lyase	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Light Blue	Blue	Dark Blue
A0A2I3BQA5	Leucine-rich repeat and guanylate kinase domain-containing protein	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q8BLK3	Limbic system-associated membrane protein	Light Blue	Blue	Dark Blue
P60469	Liprin-alpha-3	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q91WC3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q99PU5	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	Light Blue	Blue	Dark Blue
A2AJI0	MAP7 domain-containing protein 1	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q6T264	Mastermind-like protein 1	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q8K4L6	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q9EQ20	Aldehyde dehydrogenase family 6 member A1	Light Blue	Blue	Dark Blue
Q91VN4	MIC	Light Blue	Blue	Dark Blue
P27546	Microtubule-associated protein 4	Light Blue	Blue	Dark Blue

Tablo 6.6.5. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-5.

Kod	İsim	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6	Light	Light	Light
Q8R001	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	Light	Light	Light
Q9JM52	Misshapen-like kinase 1	Light	Light	Light
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Light	Light	Light
Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein	Light	Light	Light
Q9CXJ4	Mitochondrial potassium channel ATP-binding subunit	Light	Light	Light
P28665	Murinoglobulin-1	Light	Light	Light
P60202	Myelin proteolipid protein	Light	Light	Light
Q3UIZ8	Myosin light chain kinase 3	Light	Light	Light
I7HPW8	Myosin XVb	Light	Light	Light
Q99LC3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Light	Light	Light
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Light	Light	Light
Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	Light	Light	Light
Q9Z1P6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	Light	Light	Light
Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Light	Light	Light
Q3U422	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	Light	Light	Light
Q8BMF3	NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	Light	Light	Light
P28660	Nck-associated protein 1	Light	Light	Light
Q6NZK2	NCK-associated protein 5	Light	Light	Light
P11627	Neural cell adhesion molecule L1	Light	Light	Light
Q9CS84	Neurexin-1	Light	Light	Light
P55066	Neurocan core protein	Light	Light	Light
Q8BHN3	Neutral alpha-glucosidase AB	Light	Light	Light
Q9CZ44	NSFL1 cofactor p47	Light	Light	Light
Q61937	Nucleophosmin	Light	Light	Light
F8WIP8	Osteopontin	Light	Light	Light
Q9ESF1	Otoferlin	Light	Light	Light
B2RXT3	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	Light	Light	Light
Q8R326	Paraspeckle component 1	Light	Light	Light
O70589	Peripheral plasma membrane protein CASK	Light	Light	Light
Q61171	Peroxiredoxin-2	Light	Light	Light
A0A1B0GRJ9	Phosphodiesterase	Light	Light	Light
Q8R574	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	Light	Light	Light
G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Light	Light	Light
P63005	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Light	Light	Light
P29341	Polyadenylate-binding protein 1	Light	Light	Light
P0CG49	Polyubiquitin-B	Light	Light	Light
Q61838	Pregnancy zone protein	Light	Light	Light
Q61656	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	Light	Light	Light
P62962	Profilin-1	Light	Light	Light

Tablo 6.6.6. Protein ifadesi artırılan RevErba/β 'nin proteom tablosu-6.

Kod	İsim	Lv- Reverba	Lv- Reverbβ	Lv- Reverba/β
Q91ZA3	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Light Blue	Light Red	Red
Q99MN9	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	White	Light Red	Red
Q9QXV0	ProSAAS	Light Red	Light Red	Red
Q9R1P4	Proteasome subunit alpha type-1	Light Blue	Light Red	Red
O09061	Proteasome subunit beta type-1	Light Blue	Blue	Blue
P99026	Proteasome subunit beta type-4	White	Light Red	Red
O55234	Proteasome subunit beta type-5	Light Red	Blue	Blue
V9GX98	Protein bassoon (Fragment)	White	Light Red	Light Red
Q8BUK6	Protein Hook homolog 3	Light Blue	Blue	Blue
Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	Light Red	Light Red	Red
P49443	Protein phosphatase 1A	Light Blue	Light Red	Light Red
D3Z3A0	Protein phosphatase inhibitor 2	Light Red	Light Red	Red
Q9QX47	Protein SON	White	Light Red	Light Red
E9PV87	Protein TALPID3	Light Blue	Blue	Blue
Q68FL4	Putative adenosylhomocysteinase 3	Light Blue	Blue	Blue
Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Light Red	Light Red	Red
P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Light Blue	Blue	Blue
Q61598	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Light Blue	Blue	Blue
P26043	Radixin	White	Light Red	Light Red
P34022	Ran-specific GTPase-activating protein	Light Red	Light Red	Red
F6SEU4	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP	Light Red	Light Red	Red
P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Light Blue	Blue	Blue
P53994	Ras-related protein Rab-2A	Light Blue	Blue	Blue
Q9ESK9	RB1-inducible coiled-coil protein 1	Blue	Blue	Blue
P68040	Receptor of activated protein C kinase 1	Light Blue	Blue	Blue
A2A8L5	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	Light Red	Red	Red
B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	White	Light Red	Red
Q3UJU9	Regulator of microtubule dynamics protein 3	Light Red	Light Red	Light Red
Q8K4Q0	Regulatory-associated protein of mTOR	Light Red	Red	Red
Q8BP92	Reticulocalbin-2	Light Red	Light Red	Light Red
A3QM89	Reticulon (Fragment)	Light Blue	Blue	Blue
Q9CPN9	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	Light Red	Light Red	Red
Q99PL5	Ribosome-binding protein 1	Light Blue	Light Red	Red
A0A571BDQ7	Riken cDNA 1810020O05 gene	Light Red	Light Red	Light Red
Q91VM5	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	White	Light Red	Red
Q9CQE8	RNA transcription, translation and transport factor protein	Light Blue	Blue	Light Blue
A7XUY5	Selection and upkeep of intraepithelial T-cells protein 5	Light Red	White	Red
Q64105	Sepiapterin reductase	Light Red	Blue	Blue
A0A5F8MP96	Septin-4	Light Blue	Blue	Blue
A0A0R4J0I1	Serine protease inhibitor A3K	Light Blue	Blue	Light Red

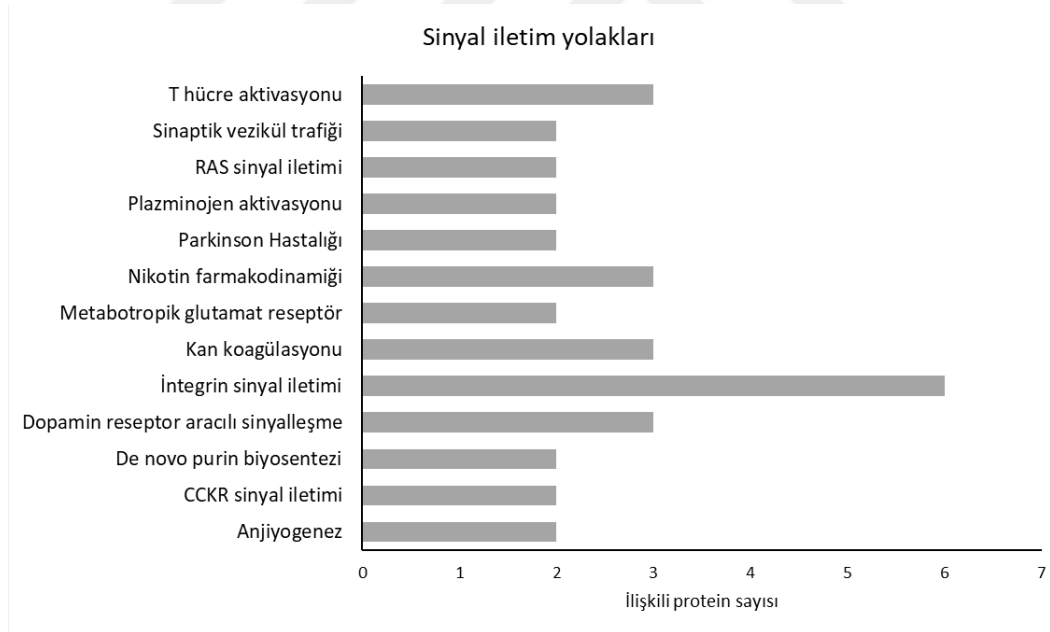
Tablo 6.6.7. Protein ifadesi artırılan RevErba/ β 'nin proteom tablosu-7.

Kod	İsim	Lv- Reverba	Lv- Reverb β	Lv- Reverba/ β
Q03734	Serine protease inhibitor A3M			
Q8CIN4	Serine/threonine-protein kinase PAK 2			
P58389	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator			
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit			
Q921I1	Serotransferin			
Q4ACU6	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3			
Q925N0	Sideroflexin-5			
G3X9M2	SKI/DACH domain-containing protein 1			
P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1			
Q91V14	Solute carrier family 12 member 5			
P17809	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1			
A0A5F8MPJ2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1			
P15508	Spectrin beta chain, erythrocytic			
Q3UJB0	Splicing factor 3b, subunit 2			
Q60598	Src substrate cortactin			
Q78PY7	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1			
Q99JB2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial			
Q8BWF0	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial			
P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial			
Q64332	Synapsin-2			
Q8JZP2	Synapsin-3			
Q62209	Synaptonemal complex protein 1			
Q62277	Synaptophysin			
Q8CC35	Synaptopodin			
Q8R570	Synaptosomal-associated protein 47			
P46097	Synaptotagmin-2			
P80315	T-complex protein 1 subunit delta			
P42932	T-complex protein 1 subunit theta			
A0A6I8MWZ2	Tensin 1			
P42669	Transcriptional activator protein Pur-alpha			
O35295	Transcriptional activator protein Pur-beta			
Q9WVA4	Transgelin-2			
P63028	Translationally-controlled tumor protein			
Q9D1D4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10			
Q8BMS1	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial			
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial			
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2			
E9Q453	Tropomyosin alpha-1 chain			
A4Q9E5	Tubulin monoglycylase TLL3			
P43404	Tyrosine-protein kinase ZAP-70			

Tablo 6.6.8. Protein ifadesi artırılan RevErba/β 'nin proteom tablosu-8.

Kod	İsim	Lv- Reverba	Lv- Reverbβ	Lv- Reverba/β
P54830	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 5	Light	Light	Dark
E0CX65	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Light	Dark	Dark
P97797	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Light	Dark	Dark
Q9QZM0	Ubiquilin-2	Light	Light	Dark
Q99104	Unconventional myosin-Va	Light	Light	Dark
Q62059	Versican core protein	Light	Light	Dark
Q64727	Vinculin	Light	Light	Dark
P21614	Vitamin D-binding protein	Light	Light	Dark
P62482	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	Light	Light	Dark
Q9JHB4	WD repeat-containing protein 31	Light	Light	Dark
P56695	Wolframin	Light	Light	Dark
Q03172	Zinc finger protein 40	Light	Light	Dark

Yukarıdaki tablolarda yer alan proteinlerin etkilediği sinyal iletim yolları PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships; <http://www.pantherdb.org>) programı aralığıyla analiz edilmiştir (Şekil 6.6.1.).



Şekil 6.6.1. RevErba/β protein ifadesi artırılmış grubun yolak analizi.

Yapılan biyoinformatik analizlerde en baskın olarak integrin sinyal iletim yolağının etkilendiği tespit edilmiştir. Ardından T hücre aktivasyon yolağı, nikotin farmakodinamik yolağı, dopamin reseptörü aracılı sinyal yolağı ve kan koagülasyon

yolaklarının ikincil derecede etkilendiği grlmtr. Son olarak, sinaptik vezikül trafiği yolağı, RAS yolağı, plasminojen aktivasyon yolağı, Parkinson Hastalığı, metabotropik glutamat reseptör yolağı, de novo prin biyosentezi, CCKR sinyal yolağı ve anjiyogenez yolaklarında görevli olan proteinlerin etkilendiği grlmtr.

Protein ifade artırımını yapılan gruplardaki proteinler detaylı bir Şekilde analiz edildiğinde özellikle Lv-RevErb α/β grubunda, nöronal morfoloji ve fonksiyon ile yakından ilişkili olduğu bilinen, sinaptik apparatus organelinin önemli bir komponenti olan sinaptopodin, Ras/Rap GTPaz aktive edici protein SynGAP, postsinaptik densite iskele proteinleri SAP-102 ve PSD95, presinaptik eksositoz iÇin kalsiyum sensörü olarak görev yapan sinaptotagmin-2, mikrotübül ilişkili protein (MAP) 4 ve 6, moleküler motorlar KIF21 ve KIF28'in istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde kat deđiŐimlerini tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programındaki tek yönlü (one-way) varyans analizi (Analysis of varitaion, ANOVA) kullanılarak, post-hoc testinde en düşük anlamlı farklılık testiyle (least significant difference, LSD test) analiz edilmiştir. ** $p \leq 0,01$ değerisi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

RevErb α/β 'nin protein ifadesinin baskılandığı gruplar (Sh- RevErb α , Sh- RevErb β , Sh- RevErb α/β) ve vektör olan ScRNA grubunun analizi aşağıdaki tabloda verilmiştir. Toplamda 2164 protein tanımlanmıştır ve tabloda, 2 kat değişim ve 0,5 kat ve altına inen proteinler gösterilmiştir. Bu şekilde 50 tane protein tanımlanmıştır (Tablo 6.6.9.-10).

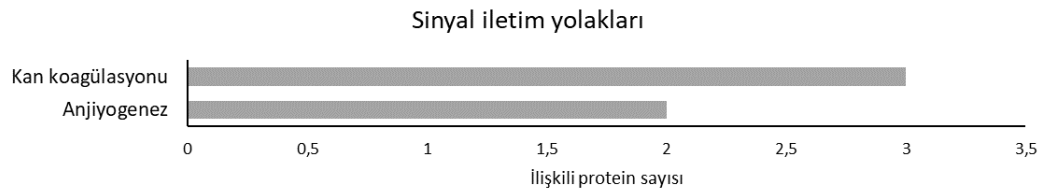
Tablo 6.6.9. Protein ifadesi baskılanan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-1.

Kod	İsim	Sh- Reverba	Sh- Reverb β	Sh- Reverba/ β
A0A0N4SVK8	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	Red	White	White
Q9Z0S1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	Blue	Blue	Blue
P70349	Adenosine 5'-monophosphoramidase HINT1	White	Blue	Blue
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	Red	White	White
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	Red	White	White
Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	Blue	Blue	Blue
Q9Z0H8	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	Red	Red	White
P23953	Carboxylesterase 1C	Red	Blue	White
Q02105	Complement C1q subcomponent subunit C	Blue	Blue	Blue
E9QNN1	DEAH box protein 9	Blue	Blue	Blue
Q08509	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	Blue	Blue	White
Q5EBJ4	Ermin	White	White	Red
A0A0U1RNJ1	Fatty acid synthase	Blue	Blue	White
E9PV24	Fibrinogen alpha chain	Red	Blue	Blue
Q64516	Glycerol kinase	Blue	White	White
Q61646	Haptoglobin	Red	Blue	White
P53564	Homeobox protein cut-like 1	Red	Red	White
P01868	Ig gamma-1 chain C region secreted form	White	Red	Red
P01872	Immunoglobulin heavy constant mu	White	Red	Red
P01837	Immunoglobulin kappa constant	White	Red	Red
O08677	Kininogen-1	Red	Blue	White
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Red	Blue	White
Q8BSS9	Liprin-alpha-2	Red	White	White
O88910	MAGUK p55 subfamily member 3	Red	White	White
Q9EQ20	Aldehyde dehydrogenase family 6 member A1	Blue	Blue	Blue
Q9JM52	Misshapen-like kinase 1	Red	Red	Red
Q9D023	Mitochondrial pyruvate carrier 2	Blue	Blue	Blue
P10923	Osteopontin	Red	White	White
O08807	Peroxiredoxin-4	Red	White	White

Tablo 6.6.10. Protein ifadesi baskılanan RevErb α/β 'nin proteom tablosu-2.

Kod	İsim	Sh- Reverba	Sh- Reverb β	Sh- Reverba/ β
Q6Q477	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	Blue	Light Blue	Blue
Q61233	Plastin-2	Light Blue	Red	Red
Q61656	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	Blue	Blue	Blue
O09114	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Blue	Blue	Blue
Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	Red	Red	Red
Q6PHN9	Ras-related protein Rab-35	Light Blue	Blue	Blue
Q64487	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	Red	Light Blue	Light Blue
Q8K0T0	Reticulon-1	Blue	Blue	Blue
Q3TA40	RIKEN cDNA 6430548M08 gene	Light Blue	Blue	Blue
Q91VM5	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	Red	Light Blue	Light Blue
Q5SUT0	RNA-binding protein EWS	Blue	Light Blue	Light Blue
P07759	Serine protease inhibitor A3K	Red	Light Blue	Light Blue
Q8CIN4	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	Blue	Light Blue	Light Blue
Q8BMC3	SHC-transforming protein 2	Blue	Blue	Blue
D3YZW1	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1	Red	Light Blue	Light Blue
P32020	Sterol carrier protein 2	Blue	Blue	Blue
A0A5F8MPH5	Synaptotagmin-like protein 2	Light Blue	Red	Red
Q571C7	Transcription factor TFIIIB component B'' homolog	Blue	Blue	Blue
P97797	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Light Blue	Red	Red
Q3V037	Uncharacterized protein C6orf163 homolog	Red	Red	Red
Q9Z2U2	Zinc finger protein 292	Blue	Blue	Blue

Protein ifadesi baskılanan gruplardan elde edilen proteinlerin biyoistatistiksel olarak değerlendirilmesi PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships; <http://www.pantherdb.org>) programı aralığıyla yapılmıştır



Şekil 6.6.2. RevErb α/β protein ifadesi baskılanmış grubun yolak analizi.

Yapılan analizde, üç farklı proteinin kan koagülasyonunda, iki farklı proteinin ise anjiyogenezde rolünün olduğu tespit edilmiştir.

7. TARTIŞMA

Dünyada ölüm nedenleri bakımından ikinci sırada yer alan inme vakalarının %85'lik bir kısmı beyni besleyen orta serebral arterin tıkanmasıyla meydana gelirken %15'lik bir kısmı ise beyin damarlarının hemorajı sonrasında oluşmaktadır [319]. Bu tez kapsamında kompleks bir patofizyolojiye sahip olan iskemik inme modeli için orta serebral arter oklüzyonu metodu seçilmiştir. Bu amaç için farelere 90 dk'lık orta serebral arter modeli uygulanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalar bu metodun özellikle Bederson testi, beyin enfarktüs hacmi, beyin ödemi kan beyin bariyeri geçirgenliği analizi için uygun bir metot olduğunu göstermektedir [11, 315]. Bu bilgiler dahilinde yaptığımız çalışmada 90 dakikalık MCAO, akut iskemi modeli olarak seçilmiştir. Operasyon sırasında LDF kullanılarak beyindeki kan akımı anlık olarak izlenmiş, oklüzyon ve reperfüzyon aşamaları net bir şekilde görülerek iskeminin 90 dakika ile sınırlı kaldığı teyit edilmiştir. RevErb α/β 'nin hem ifadesinin artırıldığı hem de azaltıldığı gruplarda beyin kan akımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

Farelerde indüklenen akut serebral iskemi modelinden 24 saat sonra, sakrifikasyon gerçekleştirilmeden hemen önce fareler Bederson testine göre değerlendirilmişlerdir [313]. Bu değerlendirme sonucunda protein ifadesi artırılan grupta (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β), Lv-RevErb α (*p<0.05), Lv-RevErb β (**p<0.01) ve Lv-RevErb α/β (*p<0.05) gruplarında Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında Bederson skorlarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Protein ifadesi azaltılmış gruba bakıldığında ise (ScRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , ShRevErb α/β), gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. Sirkadiyen ritimdeki değişikliklerin canlıların davranışları üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada Bmal1 delesyonunun sosyal etkileşimde, aşırı tekrarlayan davranışlarda ve stereotipide önemli eksikliklere yol açtığını ve bunların hepsinin otizm spektrum bozukluğunun temel davranışsal özelliklere benzediğini göstermektedir [320]. Ek olarak SCN'de üzerinden yapılan Bmal1 knock down (KD) farelerin kuyruktan asma testinde depresyon göstergesi olan daha fazla hareketsiz kalma davranışı sergiledikleri, aydınlık/karanlık (Light-

Dark) testinde, anksiyatif davranış göstergesi olan açık alanda daha az vakit geçirdiği ancak open field testinde toplam aktivite ve uzaysal düzeme alan tercihi konusunda bir değişiklik olmadığı görülmüştür [321]. Ayrıca yapılan bir çalışmada Per2 KO hayvanların, open field testinde normal lokomotor aktivitenin yanında, merkez alanda WT hayvanlara oranla daha fazla vakit geçirdikleri görülmüştür. Per2 genindeki değişikliklerin insanda depresyon hassasiyetine etki ettiği düşünülmektedir [322]. Buna bağlı olarak zorlu yüzme testi yapılan farelerin hareketlilik sürelerinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede azaldığı görülmüştür [323]. Ayrıca akut iskemi sonucunda hasarın motor kortekse çıkması sonucu hayvanların motor işlevlerinde bozukluklar meydana gelmekte ve bozukluklar Bederson testinde gözlemlenebilmektedir [313]. Protein ifadesi artılan grupta istatistiksel olarak nörolojik iyileşmenin olması, protein ifadesi baskılanan grupta ise istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmaması sebebiyle, var olan anlamlı değişimin sirkadiyen ritmin kontrolünden ziyade hasar alanlarının büyüklüğü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Nörolojik skorlamadan sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve beyinleri disekte edilerek kurubuz üzerinde dondurulmuştur. Dondurulan beyinler cryostat cihazı kullanılarak beynin önünden 2 mm aralıklarla, 20 µm kalınlıkta olacak şekil kesitler alınmıştır. Beynin 4 bölgesinden alınan kesitlere beyindeki hasar hacmi ve ödem hacminin hesaplanabilmesi için cresyl violet boyaması yapılmıştır [11]. Bu boyama sonucunda, protein ifadesi artırılan grupta (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β), Lv-RevErb α (*p<0.05), Lv-RevErb β (*p<0.05) ve Lv-RevErb α/β (*p<0.05) gruplarında Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında hasar hacimlerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir azalma görülmüştür. Protein ifadesi azaltılmış gruba bakıldığında ise (ScRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , ShRevErb α/β), sadece ShRevErb α/β (*p<0.05) grubunda ScRNA grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde hasarın arttığı, diğer gruplarda ile ScRNA grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde sirkadiyen ritim ve hasar ile ilişki çalışmalara bakıldığında, sirkadiyen ritimde meydana gelen bozulmaların hasar alanını etkilediği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, günün 6 saatlik dilimlerinde MCAO indüklenen farelerdeki beyinde hasar hacmi, ödem hacmi ve nörolojik skorlama değerlendirilmiş ve ZT18 periyodunda ZT0 ile kıyaslandığında

anlamli derece beyindeki hasar ve odem hacminin azaldigi, nörolojik skorlamanin da daha düşük ciktigi gözlemlenmiştir [11]. Aynı zamanda RevErb α 'nın makrofajlardaki proinflamatuvar sitokin olan IL-6 ekspresyonunun temporal salinimından sorumlu olduğu düşünölmektedir. Yapılan bir çalışmada RevErb α 'nın, NLRP3'ü direkt olarak baskıladığı ve dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş kolite karşı koruma sağladığı görölmüştür [302]. RevErb α 'nın SR9009 ve GSK4112 gibi küçük moleküllü agonistlerle farmakolojik hedeflemesi, akut veya kronik inflamasyonla ilişkili hastalıklara karşı potansiyel anti-inflamatuvar terapötikler olarak düşünölmektedir [14, 304, 324]. Yapılan bir çalışmada RevErb α 'nın SR9009 ile agonist olarak uyarılması sonucu, BMAL1 ekspresyonundan bağımsız olarak, pro-inflamatuvar sitokin üretimini ve inflamatuvar monosit infiltrasyonunu baskıladığı görölmüştür. Aynı zamanda bir çalışmada RevErb α agonisti, SR9009, uygulaması sonucu psoriatik dermatitiste (sedef hastalığı), IL-17'nin baskılanması üzerinden iyileşme olduğu görölmüştür [305]. Literatüre bakıldığında bir kemokin olan CCL2'nin ve onun reseptörü olan CCR2'nin, obezitenin indüklediği inflamasyonun başlatılmasında ve beyaz yağ dokusunda makrofajların toplanmasında önemli rolü olduğu görölmektedir [306]. Yapılan bir çalışmada RevErb α 'nın insandaki immunitenin başlamasında görevli genlerden biri olan CCL2 ile ilişkili olduğunu göstermiştir [297, 307]. Bir diğer çalışmada da RevErb α 'nın CCL2 genini direkt olarak baskıladığı ve RevErb α 'nın makrofajların inflamatuvar fonksiyonlarını ve CCL2 ile aktive olan intraselular sinyalleri baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca farelerdeki RevErb α eksikliğinde de makrofajlardaki CCL2 gen aktivasyonunun arttığı belirtilmiştir [307].

Akut iskemik inme sonucu, KBB hasar görmekte ve beyindeki inflamasyon cevabı artmaktadır. RevErb α / β 'nin protein ifadesinin artırıldığı grupta hasarın kontrol grubuna kıyasla daha düşük çıkmasının sebebi, baskılanan inflamasyon cevabından ötürü olabileceği düşünölmektedir. Ancak bu baskılanmanın spesifik olarak hangi yolaklar üzerinden olduğunun araştırılması gerekmektedir. CCL2 üzerinden ERK yolağının aktivasyonu bilinmektedir. RevErb α 'nın da CCL2 üzerinden inhibisyonuna binaen bu hasarın azalması bu yolak üzerinden olabileceği düşünölmektedir. RevErb α / β 'nin protein ifadesinin baskılandığı grupta ise,

ShRevErb α/β grubunda hasarın artması, protein ifadesi artırılan grupta immün sistemdeki baskılanmanın, bu grupta olmamasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Beyindeki ödem analizi, hasar hacmi analizi için kullanılan beyinler üzerinden eş zamanlı olarak ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır. RevErb α/β 'nin protein ifadesi artırılan gruba bakıldığında (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β), Lv-RevErb α (*p<0.05), Lv-RevErb β (*p<0.01) ve Lv-RevErb α/β (*p<0.05) gruplarında Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında ödem hacimlerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir azalma görülmüştür. Protein ifadesi azaltılmış gruba bakıldığında ise (ScRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , ShRevErb α/β), ScRNA grubu ile kıyaslandığında grupların ödem hacmi bakımından artmış bir trendi görülmekte ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığı görülmüştür. Beyin, vücudun dinlenim metabolizmasının yaklaşık olarak %20' sini kullanmaktadır ve sodyum pompaları iyonik gradiyentin homeostazisini sağlamak için bu %20' lik dilimin yarısını kapsamaktadır. Bu sebeple beyin, diğer organlarla kıyaslandığında iskemik strese karşı daha hassas olmaktadır. Yayılan depolarizasyon iyon gradiyentinin neredeyse tamamen bozulması ile karakterizedir, bunun sonucunda, nöronlarda devamlı bir depolarizasyon, elektriksel aktivite kaybı, dendritik uçlarda bozulma ve nöronal şişme meydana gelmektedir [37]. Ayrıca hasar mekanizmasını etkileyebileceği düşünülen faktörler, ödem mekanizmasına da etkileyebilmektedir. Yayılan depolarizasyonun yanında beyin parankimine giren makrofajların etkisi ile artan hasar sonucu, ekstraselular iyon gradiyentini düzenleyen hücrelerin ortadan kaldırılması ya da iskemi sonucu ölmesinden dolayı ekstraselular iyon gradiyetinin bozulması, ek olarak da hasar modelinden ötürü KBB'in bozulmasından kaynaklı iyonik dengenin korunması dokudaki ödem miktarını artırabilmektedir. RevErb α/β protein ifadesinin artırıldığı grupta, daha öncede belirtildiği üzere hasar hacimlerinin azalması, daha az doku hasarının karakterizasyonunu ve aynı zamanda da hafiflemiş patolojik koşulları gösterdiği düşünülmektedir. Bundan dolayı, ödemin de hasar hacimleri ile aynı korelasyonda çıkması olası görülmektedir.

KBB geçirgenliğinin analiz edilebilmesi için striatum seviyesinden alınan kesitlere IgG boyaması [315] yapılmıştır. Model olarak seçtiğimiz 90 dakika MCAO sonucu hasar kortekse taşmakta ve KBB bozulması görülmektedir [315]. KBB analizi için ölçümler imageJ programı kullanılarak yapılmıştır. RevErb α/β ' nin protein ifadesi artırılan grupta (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β veya Lv-RevErb α/β), Lv-RevErb α (*p<0.05), Lv-RevErb β (**p<0.01) ve Lv-RevErb α/β (*p<0.05) gruplarında Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde beyin parankimine IgG girişinin azaldığı görülmüştür. Protein ifadesi azaltılmış gruba bakıldığında ise (ScRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , ShRevErb α/β), Sh-RevErb β (*p<0.05) ve Sh-RevErb α/β (**p<0.01) gruplarında ScRNA grubu ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde beyin parankimine IgG girişi görülmüştür.

Akut iskemik inmenin ayırt edici patofizyolojik özelliklerinden biri de KBB'nin bozulmasıdır. Sıkı bağlantıların bozulmasıyla meydana gelen permeabilite artışı sonucu dolaşımdaki hücreler, makromoleküller kontrolsüz bir şekilde beyin parankimine girmekte ve beyinde sitotoksik ve vazogenik ödeme neden olmaktadır [325-327]. Akut iskemi sonucunda sayısız periferel immun hücresi iskemik hemisfere geçiş yapmaktadır [191]. Deneysel çalışmalarda, nötrofil akümülyasyonunun iskemik hemisferde 3 saat sonra anlamlı seviyede arttığını, 24 saatte ise maksimum seviyeye çıktığı görülmüştür [192]. Ek olarak, akut iskemi sonucunda ipsilateral hemisferdeki monosit sayısı, bir gün sonra artmış, 3-7 gün arasında maksimum seviyeye ulaşmış ve ardından 14 gün sonra normal seviyesine geri döndüğü gözlemlenmiştir [195]. Akut iskemi geçiren hastaların kanlarındaki T lenfositlerin sayısının 7 gün içinde katlanarak azaldığı görülmüştür [191]. İpsilateral hemisferdeki T hücre birikiminin akut iskemiye takiben 24 saatte arttığı, 3 günde maksimum seviyesine ulaştığı ve bir ay boyunca beyin parankiminde kaldığı gözlemlenmiştir [196]. Deneysel inme çalışmalarında CCR2'nin bloklanması ya da azaltılmasıyla monosit birikiminin inhibisyonu sonucu beyin ödeminde koruma görülmesine rağmen uzun dönem tedavi sürecinde bozulma gözlemlenmiştir [328, 329]. Yaptığımız analiz sonucunda, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırıldığı grupta beyin parankimine giren IgG miktarının azaldığı, RevErb α/β 'nin protein

ifadesinin baskılandığı grupta ise beyin parenkimine giren IgG miktarının arttığı gözlemlenmiştir.

Gerçekleştirilen proteomik analizler sonucu RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırıldığı gruplarda (Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α/β) iskemik hemisferde toplamda 2170 protein tanımlanmıştır ve 291 tane 2 kat değişim ve 0,5 kat ve altına inen proteinler tanımlanmıştır. Özellikle Lv-RevErb α/β grubunda, nöronal morfoloji ve fonksiyon ile yakından ilişkili olduğu bilinen, sinaptik apparatus organelinin önemli bir komponenti olan sinaptopodin, Ras/Rap GTPaz aktive edici protein SynGAP, postsinaptik densite iskele proteinleri SAP-102 ve PSD95, presinaptik eksositoz için kalsiyum sensörü olarak görev yapan sinaptotagmin-2, mikrotübül ilişkili protein (MAP) 4 ve 6, moleküler motorlar KIF21 ve KIF28'in istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde kat değişimleri tespit edilmiştir.

Glutamat toksisitesi, iskemik inmenin merkezinde yer alan patolojik olaylardan biridir. Eksitator nörotransmisyonun büyük kısmının dendritik spine yapıları üzerinden gerçekleşiyor olması [330], bu küçük aktin sitoskeletonu içeren yapıları iskemik inmede eksitotoksikite ve ödemden ilk zarar gören yapılardan biri konumuna getirmektedir [37]. Fototrombus ile kortikal iskemi yapılan bir araştırmada peri-enfarktüs bölgede iskemi sonrası 24 saat içinde dendritik spine sayısının %38 azaldığı gösterilmiştir [331]. Ayrıca, bu yapıların tekrar oluşmasının sağlanması fonksiyonel toparlanma ile ilişkilidir [332-334]. Sinaptopodin, görece büyük hacimli dendritik spine yapılarında bulunan aktin bağlayıcı bir proteindir [335]. Sinaptopodinin, aktin polimerizasyonunu teşvik ettiği ve latrunculin gibi toksinler ile depolimerizasyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir [336, 337]. SynGAP, postsinaptik densite bölgelerinde sinaptik aktiviteye cevap olarak nöronal uyarılabilirliği ve aktin polimerizasyonunu kontrol eder [338, 339]. SynGAP seviyelerinin azalması iskemi sonrası enfarktüs alanını artırırken, seviyelerinin artırılması nöroprotektif etki göstermektedir [340, 341]. SynGAP'in bu etkilerinden olasılıkla inme sonrası Ras-ERK ve RhoA-ROCK yollarının toksik seviyede aktive olmasını engellemesi ve böylece nöronların eksitotoksikiteye duyarlılığını azaltması sorumludur. Nörotransmitter reseptörleri ve çok sayıda enzimin postsinaptik bölgede lokalizasyonu için iskele görevi gören MAGUK ailesinin üyeleri SAP-102 ve PSD95

protein seviyeleri inme ve nörodejeneratif hastalıklarda sinaps eliminasyonu ile birlikte azalmaktadır [342, 343]. PSD95 merkezli tedavi girişimleri iskemi ve diğer nörolojik hastalıklarda yakın zamanda yapılan deneysel çalışmalar başarılı sonuçlar vermektedir [344, 345]. Proteomiks analizlerimizin sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırılmasının sinaptik mikromimari ve nöronal fonksiyonu koruyucu etkisini göstermektedir. Ancak, RevErb α/β 'nin nöroprotektif etkilerini doğrudan sinaptik proteinleri hedef alarak gösterip göstermediği henüz belirlenmeyi beklemektedir.

Bu bağlamda RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırılması sonucu hasar ve ödem hacminde meydana gelen azalmanın ve baskılanması sonucu hem hasar hem de ödem hacminde görülen artışın, IgG ekstrasvazasyonu ile eşleştirildiğinde, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırılması veya baskılanması sonucu meydana gelen etkilerin birkaç nedenden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan ilki KBB geçirgenliğinin etkilenmesi, KBB'nin geçirgenliğinin bozulması akut iskemik inmede hasarı artırıcı bir etki göstermekte ve patofizyolojik koşulları ağırlaştırmaktadır. Bir diğeri ise, inflamasyon üzerinden gerçekleşen etkiyi içermektedir. İnflamasyon KBB bariyerinin bozulması ile eş zamanlı olarak beyin parenkiminde hasarı artırıcı bir etki göstermektedir. Ancak sadece KBB ile değil akut dönemde microglial aktivasyon ile başlayan infiltrasyonun kontrolü hasarı azaltıcı bir etki gösterebilmektedir. Proteomik analizlere de bakıldığında RevErb α/β protein ifadesi artırılan grupta ipsilateral hemisferde hücre iskeleti proteinleri ve sinapsı intakt durumda tutan proteinlerin anlamlı seviye yüksek miktarlarda bulunması penumbral alanın korunduğunu bizlere düşündürmektedir. Bu da bizlere RevErb α/β proteinlerinin hücre sel sinyalleşme üzerinden de hasar mekanizmaları üzerine bir etki gösterme olasılığını düşündürmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalar RevErb α/β 'nin hem sirkadiyen ritim dışındaki görevlerinin aydınlatılmasında hem de yaptığımız çalışmada görüldüğü üzere hasar hacmi, ödem hacmi ve KBB geçirgenliğine etkilerinin yanında immum sistem ve hücre sel sinyalleşme ile olabilecek ilişkileri gelecekte kişilerin sirkadiyen ritimleri bozulmadan, iskemi ile karşılaşmadan ya da karşılaştıktan sonraki süreçteki tedavi yolunda etkili birer hedef molekülü olabileceklerini düşündürmektedir.

8. SONUÇ

Bu proje kapsamında RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artırılmasının ya da baskılanmasının akut iskemik hasar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, RevErb α/β 'nin protein ifadesini hem artıran hem de azaltan virüs partikülleri dizayn edilmiş ve bu partiküller farelere beyin içi enjeksiyon yöntemiyle verilip, serebral iskemi modeli uygulanmıştır. Ardından farelerdeki, nörolojik durum, enfarktüs hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin yanında beyin dokusundan alınan örnekler ile proteomik analizler yapılmıştır.

Sonuç olarak, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artması akut serebral iskemide hasar hacmini, ödem hacmini ve beyin parankimine giren IgG miktarını azaltarak akut iskeminin getirdiği patolojik etkileri azaltmıştır. RevErb α/β 'nin protein ifadesinin baskılanması sonucu ise, hasar hacmi, ödem hacmi ve beyin parankimine giren IgG miktarı artmıştır. Bu bağlamda, RevErb α/β 'nin protein ifadesinin artması, akut serebral iskemide koruyucu etkisi olduğu, protein ifadesinin baskılanmasının ise patolojik etkileri artırdığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, geniş ölçekli proteomik analizlerle iskemik beyin dokusundan tanımlanan proteinlerin hem beyin felciyle hem de RevErb α/β ile direkt veya dolaylı yollardan ilişkili olduğu düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Machado, MF, Brucki, SM, Nogueira, CF, and Rocha, MS. (2013). Infectious disease is the most common cause of death among stroke patients: two-years of follow-up. *Arq Neuropsiquiatr* **71**, 371-375. doi: 10.1590/0004-282X20130041.
2. Campbell, BCV, De Silva, DA, Macleod, MR, Coutts, SB, Schwamm, LH, Davis, SM, et al. (2019). Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 70. doi: 10.1038/s41572-019-0118-8.
3. Feigin, VL, Krishnamurthi, RV, Parmar, P, Norrving, B, Mensah, GA, Bennett, DA, et al. (2015). Update on the Global Burden of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in 1990-2013: The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology* **45**, 161-176. doi: 10.1159/000441085.
4. Gorelick, PB. (2019). The global burden of stroke: persistent and disabling. *Lancet Neurol* **18**, 417-418. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30030-4.
5. Gustavsson, A, Svensson, M, Jacobi, F, Allgulander, C, Alonso, J, Beghi, E, et al. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* **21**, 718-779. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.08.008.
6. Heidenreich, PA, Trogdon, JG, Khavjou, OA, Butler, J, Dracup, K, Ezekowitz, MD, et al. (2011). Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* **123**, 933-944. doi: 10.1161/CIR.0b013e31820a55f5.
7. Soler, EP, and Ruiz, VC. (2010). Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Curr Cardiol Rev* **6**, 138-149. doi: 10.2174/157340310791658785.
8. Wolfe, CD, Crichton, SL, Heuschmann, PU, McKeivitt, CJ, Toschke, AM, Grieve, AP, et al. (2011). Estimates of outcomes up to ten years after stroke: analysis from the prospective South London Stroke Register. *PLoS Med* **8**, e1001033. doi: 10.1371/journal.pmed.1001033.
9. Krishnamurthi, RV, Deveber, G, Feigin, VL, Barker-Collo, S, Fullerton, H, Mackay, MT, et al. (2015). Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in children and youth aged 0-19 years: data from the global and regional burden of stroke 2013. *Neuroepidemiology* **45**, 177-189. doi: 10.1159/000441085.
10. Schallner, N, Lieberum, JL, Gallo, D, LeBlanc, RH, 3rd, Fuller, PM, Hanafy, KA, et al. (2017). Carbon Monoxide Preserves Circadian Rhythm to Reduce the Severity of Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Stroke* **48**, 2565-2573. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.016165.
11. Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, AB, Turkseven, S, Gurel, B, et al. (2018). Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* **55**, 2565-2576. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
12. Duffy, JF, and Czeisler, CA. (2009). Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin* **4**, 165-177. doi: 10.1016/j.jsmc.2009.01.004.

13. Fisk, AS, Tam, SKE, Brown, LA, Vyazovskiy, VV, Bannerman, DM, and Peirson, SN. (2018). Light and Cognition: Roles for Circadian Rhythms, Sleep, and Arousal. *Front Neurol* **9**, 56. doi: 10.3389/fneur.2018.00056.
14. Griffin, P, Dimitry, JM, Sheehan, PW, Lananna, BV, Guo, C, Robinette, ML, et al. (2019). Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 5102-5107. doi:
15. Obrenovitch, TP, Urenjak, J, Richards, DA, Ueda, Y, Curzon, G, and Symon, L. (1993). Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischaemia: comparison between penumbral conditions and ischaemia with sustained anoxic depolarisation. *Journal of neurochemistry* **61**, 178-186. doi:
16. Nowak, L, Bregestovski, P, Ascher, P, Herbet, A, and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465. doi:
17. Mayer, ML, and Miller, RJ. (1990). Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons. *Trends in pharmacological sciences* **11**, 254-260. doi:
18. Wu, QJ, and Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular brain* **11**, 1-14. doi:
19. Raghavendra Rao, VL, Bowen, KK, and Dempsey, RJ. (2001). Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochemical research* **26**, 497-502. doi:
20. Tarassishin, L, Suh, HS, and Lee, SC. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia* **62**, 999-1013. doi:
21. Liddelow, SA, Guttenplan, KA, Clarke, LE, Bennett, FC, Bohlen, CJ, Schirmer, L, et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481-487. doi:
22. Choudhury, GR, and Ding, S. (2016). Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiology of disease* **85**, 234-244. doi:
23. Dewar, D, Underhill, SM, and Goldberg, MP. (2003). Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **23**, 263-274. doi:
24. Tanaka, K, Nogawa, S, Suzuki, S, Dembo, T, and Kosakai, A. (2003). Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain. *Brain research* **989**, 172-179. doi:
25. Hall, CN, Reynell, C, Gesslein, B, Hamilton, NB, Mishra, A, Sutherland, BA, et al. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60. doi:
26. Wojcik, C, and Di Napoli, M. (2004). Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategies in stroke therapy. *Stroke* **35**, 1506-1518. doi:
27. Zhang, K, Yan, J, Wang, L, Tian, X, Zhang, T, Guo, L, et al. (2018). The Pyk2/MCU pathway in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemic stroke. *Neuroscience Research* **131**, 52-62. doi:
28. Chamorro, A, Meisel, A, Planas, AM, Urra, X, Van De Beek, D, and Veltkamp, R. (2012). The immunology of acute stroke. *Nature reviews neurology* **8**, 401-410. doi:

29. Wimmer, I, Zrzavy, T, and Lassmann, H. (2018). Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions. *Journal of neuroimmunology* **323**, 10-18. doi:
30. Zrzavy, T, Machado-Santos, J, Christine, S, Baumgartner, C, Weiner, HL, Butovsky, O, et al. (2018). Dominant role of microglial and macrophage innate immune responses in human ischemic infarcts. *Brain Pathology* **28**, 791-805. doi:
31. Martinez, FO, and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* **6**doi:
32. Maysami, S, Wong, R, Pradillo, JM, Denes, A, Dhungana, H, Malm, T, et al. (2016). A cross-laboratory preclinical study on the effectiveness of interleukin-1 receptor antagonist in stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **36**, 596-605. doi:
33. Elkins, J, Veltkamp, R, Montaner, J, Johnston, SC, Singhal, AB, Becker, K, et al. (2017). Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. *The Lancet Neurology* **16**, 217-226. doi:
34. Mestre, H, Du, T, Sweeney, AM, Liu, G, Samson, AJ, Peng, W, et al. (2020). Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling. *Science* **367**, eaax7171. doi:
35. Kirov, SA, Fomitcheva, IV, and Sword, J. (2020). Rapid neuronal ultrastructure disruption and recovery during spreading depolarization-induced cytotoxic edema. *Cerebral Cortex* **30**, 5517-5531. doi:
36. Dreier, JP, and Reiffurth, C. (2017). Exploitation of the spreading depolarization-induced cytotoxic edema for high-resolution, 3D mapping of its heterogeneous propagation paths. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 2112-2114. doi:
37. Dreier, JP. (2011). The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature medicine* **17**, 439-447. doi:
38. Andrew, RD, Labron, MW, Boehnke, SE, Carnduff, L, and Kirov, SA. (2007). Physiological evidence that pyramidal neurons lack functional water channels. *Cerebral Cortex* **17**, 787-802. doi:
39. Hellas, JA, and Andrew, RD. (2021). Neuronal swelling: a non-osmotic consequence of spreading depolarization. *Neurocritical Care* **35**, 112-134. doi:
40. Woitzik, J, Hecht, N, Pinczolits, A, Sandow, N, Major, S, Winkler, MK, et al. (2013). Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology* **80**, 1095-1102. doi:
41. Strong, AJ, Anderson, PJ, Watts, HR, Virley, DJ, Lloyd, A, Irving, EA, et al. (2007). Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain* **130**, 995-1008. doi:
42. Dreier, JP, and Reiffurth, C. (2015). The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* **86**, 902-922. doi:
43. Bogdanov, VB, Middleton, NA, Theriot, JJ, Parker, PD, Abdullah, OM, Ju, YS, et al. (2016). Susceptibility of primary sensory cortex to spreading depolarizations. *Journal of Neuroscience* **36**, 4733-4743. doi:

44. Aitken, P, Borgdorff, A, Juta, A, Kiehart, D, Somjen, G, and Wadman, W. (1998). Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Pflügers Archiv* **436**, 991-998. doi:
45. Shen, Q, Ren, H, Cheng, H, Fisher, M, and Duong, TQ. (2005). Functional, perfusion and diffusion MRI of acute focal ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **25**, 1265-1279. doi:
46. Pignataro, G, Simon, RP, and Boison, D. (2007). Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **27**, 1-5. doi:
47. Memezawa, H, Smith, M-L, and Siesjö, B. (1992). Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **23**, 552-559. doi:
48. Lückl, J, Lemale, CL, Kola, V, Horst, V, Khojasteh, U, Oliveira-Ferreira, AI, et al. (2018). The negative ultraslow potential, electrophysiological correlate of infarction in the human cortex. *Brain* **141**, 1734-1752. doi:
49. Kaminogo, M, Suyama, K, Ichikura, A, Onizuka, M, and Shibata, S. (1998). Anoxic depolarization determines ischemic brain injury. *Neurological research* **20**, 343-348. doi:
50. Heiss, WD, and Rosner, G. (1983). Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **14**, 294-301. doi:
51. Dreier, JP, Fabricius, M, Ayata, C, Sakowitz, OW, William Shuttleworth, C, Dohmen, C, et al. (2017). Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: review and recommendations of the COSBID research group. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **37**, 1595-1625. doi:
52. Nozari, A, Dilekoz, E, Sukhotinsky, I, Stein, T, Eikermann-Haerter, K, Liu, C, et al. (2010). Microemboli may link spreading depression, migraine aura, and patent foramen ovale. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **67**, 221-229. doi:
53. Hartings, JA, Shuttleworth, CW, Kirov, SA, Ayata, C, Hinzman, JM, Foreman, B, et al. (2017). The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: examining Leao's legacy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **37**, 1571-1594. doi:
54. Sugaya, E, Takato, M, and Noda, Y. (1975). Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *Journal of Neurophysiology* **38**, 822-841. doi:
55. Sawant-Pokam, P, Suryavanshi, P, Mendez, J, Dudek, F, and Brennan, K. (2016). Mechanisms of neuronal silencing after cortical spreading depression. *Cerebral Cortex* **27**, bhv328. doi:
56. Hartings, JA, Rolli, ML, Lu, X-CM, and Tortella, FC. (2003). Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *Journal of Neuroscience* **23**, 11602-11610. doi:
57. Largo, C, Cuevas, P, Somjen, GG, Del Rio, RM, and Herreras, O. (1996). The effect of depressing glial function in rat brain in situ on ion homeostasis,

- synaptic transmission, and neuron survival. *Journal of Neuroscience* **16**, 1219-1229. doi:
58. von Bornstädt, D, Houben, T, Seidel, JL, Zheng, Y, Dilekoz, E, Qin, T, et al. (2015). Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origins of spreading injury depolarizations. *Neuron* **85**, 1117-1131. doi:
 59. Dreier, JP, Körner, K, Ebert, N, Görner, A, Rubin, I, Back, T, et al. (1998). Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **18**, 978-990. doi:
 60. Shin, HK, Dunn, AK, Jones, PB, Boas, DA, Moskowitz, MA, and Ayata, C. (2006). Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**, 1018-1030. doi:
 61. Bere, Z, Obrenovitch, TP, Bari, F, and Farkas, E. (2014). Ischemia-induced depolarizations and associated hemodynamic responses in incomplete global forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* **260**, 217-226. doi:
 62. Dreier, JP, Ebert, N, Priller, J, Megow, D, Lindauer, U, Klee, R, et al. (2000). Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *Journal of neurosurgery* **93**, 658-666. doi:
 63. Gottron, MA, and Lo, DC. (2009) The Na⁺/K⁺-ATPase as a drug target for ischemic stroke. In *New strategies in stroke intervention* pp. 129-151, Springer
 64. Dobretsov, M, and Stimers, JR. (2005). Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **10**, 2373-2396. doi:
 65. Czéh, G, Aitken, PG, and Somjen, GG. (1992). Whole-cell membrane current and membrane resistance during hypoxic spreading depression. *Neuroreport* **3**, 197-200. doi:
 66. Czéh, G, Aitken, PG, and Somjen, GG. (1993). Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization. *Brain research* **632**, 195-208. doi:
 67. Tanaka, E, Yamamoto, S, Kudo, Y, Mihara, S, and Higashi, H. (1997). Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* **78**, 891-902. doi:
 68. Joshi, I, and Andrew, R. (2001). Imaging anoxic depolarization during ischemia-like conditions in the mouse hemi-brain slice. *Journal of neurophysiology* **85**, 414-424. doi:
 69. Anderson, TR, Jarvis, CR, Biedermann, AJ, Molnar, C, and Andrew, RD. (2005). Blocking the anoxic depolarization protects without functional compromise following simulated stroke in cortical brain slices. *Journal of neurophysiology* **93**, 963-979. doi:

70. Risher, WC, Ard, D, Yuan, J, and Kirov, SA. (2010). Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra. *Journal of Neuroscience* **30**, 9859-9868. doi:
71. Petzold, GC, Windmüller, O, Haack, S, Major, S, Buchheim, K, Megow, D, et al. (2005). Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* **36**, 1270-1277. doi:
72. Murphy, TH, Li, P, Betts, K, and Liu, R. (2008). Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *Journal of Neuroscience* **28**, 1756-1772. doi:
73. Vincent, P, and Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* **158**, 309-323. doi:
74. Lipton, SA. (2008). NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nature neuroscience* **11**, 381-382. doi:
75. Chen, CJ, Liao, SL, and Kuo, JS. (2000). Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* **75**, 1557-1565. doi:
76. Liang, C. (2010). Negative regulation of autophagy. *Cell Death & Differentiation* **17**, 1807-1815. doi:
77. Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry* **79**, 368-376. doi:
78. Cowan, CM, Fan, MM, Fan, J, Shehadeh, J, Zhang, LY, Graham, RK, et al. (2008). Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *Journal of Neuroscience* **28**, 12725-12735. doi:
79. Walker, FO. (2007). Huntington's disease. *The Lancet* **369**, 218-228. doi:
80. Tracy, SW. (2007) *Alcoholism in America: From reconstruction to prohibition*, JHU Press
81. Mark, LP, Prost, RW, Ulmer, JL, Smith, MM, Daniels, DL, Strottmann, JM, et al. (2001). Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *American journal of neuroradiology* **22**, 1813-1824. doi:
82. Asomugha, CO, Linn, DM, and Linn, CL. (2010). ACh receptors link two signaling pathways to neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in isolated RGCs. *Journal of neurochemistry* **112**, 214-226. doi:
83. Collison, KS, Maqbool, Z, Saleh, SM, Inglis, A, Makhoul, NJ, Bakheet, R, et al. (2009). Effect of dietary monosodium glutamate on trans fat-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of lipid research* **50**, 1521-1537. doi:
84. Wada, T, Naito, M, Kenmochi, H, Tsuneki, H, and Sasaoka, T. (2007). Chronic nicotine exposure enhances insulin-induced mitogenic signaling via up-regulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors in isolated rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology* **148**, 790-799. doi:
85. Hynd, MR, Scott, HL, and Dodd, PR. (2004). Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **90**, 913-919. doi:
86. Gagliardi, RJ. (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* **58**, 583-588. doi:

87. Adám-Vizi, V. (2000). Neuroprotective effect of sodium channel blockers in ischemia: the pathomechanism of early ischemic dysfunction. *Orvosi Hetilap* **141**, 1279-1286. doi:
88. Eisenberg-Lerner, A, Bialik, S, Simon, H-U, and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death & Differentiation* **16**, 966-975. doi:
89. Chen, Q-Y, Alarcon, S, Tharp, A, Ahmed, OM, Estrella, NL, Greene, TA, et al. (2009). Perceptual variation in umami taste and polymorphisms in TAS1R taste receptor genes. *The American journal of clinical nutrition* **90**, 770S-779S. doi:
90. Watkins, B, Petersen, S, and Ryan, P. (2008). Interactions between seabirds and deep-water hake trawl gear: an assessment of impacts in South African waters. *Animal conservation* **11**, 247-254. doi:
91. Hu, N-W, Ondrejcek, T, and Rowan, MJ. (2012). Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: update on recent advances. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **100**, 855-862. doi:
92. Sapolsky, R. (2005) *Biology and Human Behavior: The Neurological Origins of Individuality* 2nd Edition. The Teaching Company Limited Partnership
93. Okubo, Y, Sekiya, H, Namiki, S, Sakamoto, H, Inuma, S, Yamasaki, M, et al. (2010). Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 6526-6531. doi:
94. Yu, SY, Wu, DC, Liu, L, Ge, Y, and Wang, YT. (2008). Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *Journal of neurochemistry* **106**, 889-899. doi:
95. Ma, D, Lu, P, Yan, C, Fan, C, Yin, P, Wang, J, et al. (2012). Structure and mechanism of a glutamate–GABA antiporter. *Nature* **483**, 632-636. doi:
96. Goto, H, Watanabe, K, Araragi, N, Kageyama, R, Tanaka, K, Kuroki, Y, et al. (2009). The identification and functional implications of human-specific "fixed" amino acid substitutions in the glutamate receptor family. *BMC evolutionary biology* **9**, 1-10. doi:
97. Spandou, E, Soubasi, V, Papoutsopoulou, S, Augoustides-Savvopoulou, P, Loizidis, T, Pazaiti, A, et al. (2007). Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reproductive sciences* **14**, 667-677. doi:
98. Chen, HSV, and Lipton, SA. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of neurochemistry* **97**, 1611-1626. doi:
99. Maragakis, NJ, and Rothstein, JD. (2006). Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature clinical practice Neurology* **2**, 679-689. doi:
100. Gottlieb, M, Wang, Y, and Teichberg, VI. (2003). Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *Journal of neurochemistry* **87**, 119-126. doi:
101. Zlotnik, A, Gurevich, B, Tkachov, S, Maoz, I, Shapira, Y, and Teichberg, VI. (2007). Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Experimental neurology* **203**, 213-220. doi:

102. Ikonomidou, C, and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *The Lancet Neurology* **1**, 383-386. doi:
103. Lee, H-g, Zhu, X, Casadesus, G, Pallàs, M, Camins, A, O'Neill, MJ, et al. (2009). The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival. *Brain research* **1249**, 244-250. doi:
104. Nicholls, D. (2004). Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current molecular medicine* **4**, 149-177. doi:
105. Farooqui, T, and Farooqui, AA. (2009). Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mechanisms of ageing and development* **130**, 203-215. doi:
106. Calì, T, Ottolini, D, and Brini, M. (2011). Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors* **37**, 228-240. doi:
107. Choi, DW, Koh, J-y, and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *Journal of Neuroscience* **8**, 185-196. doi:
108. Berdichevsky, E, Riveros, N, Sánchez-Armáss, S, and Orrego, F. (1983). Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neuroscience letters* **36**, 75-80. doi:
109. Belur, PK, Chang, JJ, He, S, Emanuel, BA, and Mack, WJ. (2013). Emerging experimental therapies for intracerebral hemorrhage: targeting mechanisms of secondary brain injury. *Neurosurgical focus* **34**, E9. doi:
110. Islam, MT. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research* **39**, 73-82. doi:
111. Oakes, SA, and Papa, FR. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual review of pathology* **10**, 173. doi:
112. Forrester, SJ, Kikuchi, DS, Hernandez, MS, Xu, Q, and Griendling, KK. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research* **122**, 877-902. doi:
113. Malik, AR, and Willnow, TE. (2019). Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system. *International journal of molecular sciences* **20**, 5671. doi:
114. Pekny, M, Wilhelmsson, U, and Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters* **565**, 30-38. doi:
115. Nayernia, Z, Jaquet, V, and Krause, K-H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 2815-2837. doi:
116. Vicente-Gutierrez, C, Bonora, N, Bobo-Jimenez, V, Jimenez-Blasco, D, Lopez-Fabuel, I, Fernandez, E, et al. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature metabolism* **1**, 201-211. doi:
117. Alfonso-Loeches, S, Ureña-Peralta, JR, Morillo-Bargues, MJ, Oliver-De La Cruz, J, and Guerri, C. (2014). Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 216. doi:

118. Dal-Cim, T, Poluceno, GG, Lanznaster, D, de Oliveira, KA, Nedel, CB, and Tasca, CI. (2019). Guanosine prevents oxidative damage and glutamate uptake impairment induced by oxygen/glucose deprivation in cortical astrocyte cultures: involvement of A1 and A2A adenosine receptors and PI3K, MEK, and PKC pathways. *Purinergic Signalling* **15**, 465-476. doi:
119. Kacimi, R, Giffard, RG, and Yenari, MA. (2011). Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *Journal of inflammation* **8**, 1-15. doi:
120. Becerra-Calixto, A, and Cardona-Gómez, GP. (2017). The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Frontiers in molecular neuroscience* **10**, 88. doi:
121. Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* **62**, 649-671. doi:
122. Haskew-Layton, RE, Payappilly, JB, Smirnova, NA, Ma, TC, Chan, KK, Murphy, TH, et al. (2010). Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 17385-17390. doi:
123. Nathan, C, and Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology* **13**, 349-361. doi:
124. Tejero, J, Shiva, S, and Gladwin, MT. (2019). Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological reviews* **99**, 311-379. doi:
125. André-Lévigne, D, Modarressi, A, Pepper, MS, and Pittet-Cuénod, B. (2017). Reactive oxygen species and NOX enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repair. *International journal of molecular sciences* **18**, 2149. doi:
126. Massaad, CA, and Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 2013-2054. doi:
127. Yang, S, and Lian, G. (2020). ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Molecular and cellular biochemistry* **467**, 1-12. doi:
128. Lopez-Fabuel, I, Le Douce, J, Logan, A, James, AM, Bonvento, G, Murphy, MP, et al. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 13063-13068. doi:
129. Andrabi, SS, Parvez, S, and Tabassum, H. (2020). Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets. *Protoplasma* **257**, 335-343. doi:
130. Chouchani, ET, Pell, VR, Gaude, E, Aksentijević, D, Sundier, SY, Robb, EL, et al. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431-435. doi:
131. Zorov, DB, Juhaszova, M, and Sollott, SJ. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* **94**, 909-950. doi:
132. Ma, X, He, P, Sun, P, and Han, P. (2010). Lipoic acid: an immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 5086-5092. doi:

133. Wang, Y, Branicky, R, Noë, A, and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* **217**, 1915-1928. doi:
134. Brown, GC, and Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* **12**, 1-4. doi:
135. Qu, Z, Chen, Y, Luo, Z-H, Shen, X-L, and Hu, Y-J. (2020). 7-methoxyflavanone alleviates neuroinflammation in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells by inhibiting TLR4/MyD88/MAPK signalling and activating the Nrf2/NQO-1 pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **72**, 385-395. doi:
136. Pacquelet, S, Johnson, JL, Ellis, BA, Brzezinska, AA, Lane, WS, Munafo, DB, et al. (2007). Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochemical Journal* **403**, 451-461. doi:
137. Apolloni, S, Parisi, C, Pesaresi, MG, Rossi, S, Carri, MT, Cozzolino, M, et al. (2013). The NADPH oxidase pathway is dysregulated by the P2X7 receptor in the SOD1-G93A microglia model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Immunology* **190**, 5187-5195. doi:
138. Zhou, H, Liao, J, Aloor, J, Nie, H, Wilson, BC, Fessler, MB, et al. (2013). CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *The Journal of Immunology* **190**, 115-125. doi:
139. Armogida, M, Nisticò, R, and Mercuri, NB. (2012). Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *British journal of pharmacology* **166**, 1211-1224. doi:
140. Bulhak, AA, Jung, C, Ostenson, C-G, Lundberg, JO, Sjoquist, P-O, and Pernow, J. (2009). PPAR- α activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-kinase/Akt and NO pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **296**, H719-H727. doi:
141. Lenz, IJ, Plesnila, N, and Terpolilli, NA. (2021). Role of endothelial nitric oxide synthase for early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **41**, 1669-1681. doi:
142. Liu, H, Li, J, Zhao, F, Wang, H, Qu, Y, and Mu, D. (2015). Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Reviews in the Neurosciences* **26**, 105-117. doi:
143. Shen, J, Ma, S, Chan, P, Lee, W, Fung, PC, Cheung, RT, et al. (2006). Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *Journal of neurochemistry* **96**, 1078-1089. doi:
144. Moriyama, M, Fujitsuka, S, Kawabe, K, Takano, K, and Nakamura, Y. (2018). Zinc potentiates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured primary rat astrocytes. *Neurochemical Research* **43**, 363-374. doi:
145. Jomova, K, and Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**, 65-87. doi:
146. Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 5839-5848. doi:

147. Kim, DW, Im, S-H, Kim, J-Y, Kim, D-E, Oh, GT, and Jeong, S-W. (2009). Decreased brain edema after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of neurosurgery* **111**, 995-1000. doi:
148. Zheng, L, Ding, J, Wang, J, Zhou, C, and Zhang, W. (2016). Effects and mechanism of action of inducible nitric oxide synthase on apoptosis in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. *The Anatomical Record* **299**, 246-255. doi:
149. Fern, R, and Matute, C. (2019). Glutamate receptors and white matter stroke. *Neuroscience Letters* **694**, 86-92. doi:
150. Wang, Z, Wei, X, Liu, K, Zhang, X, Yang, F, Zhang, H, et al. (2013). NOX2 deficiency ameliorates cerebral injury through reduction of complexin II-mediated glutamate excitotoxicity in experimental stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 942-951. doi:
151. Choi, DW. (2020). Excitotoxicity: still hammering the ischemic brain in 2020. *Frontiers in neuroscience* **14**, 579953. doi:
152. Khatri, N, Thakur, M, Pareek, V, Kumar, S, Sharma, S, and Datusalia, AK. (2018). Oxidative stress: major threat in traumatic brain injury. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* **17**, 689-695. doi:
153. Nicholls, DG. (2009). Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1787**, 1416-1424. doi:
154. Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* **12**, 991-1045. doi:
155. Alexander, SP, Fabbro, D, Kelly, E, Mathie, A, Peters, JA, Veale, EL, et al. (2021). THE concise guide to pharmacology 2021/22: catalytic receptors. *British Journal of Pharmacology* **178**, S264-S312. doi:
156. Gülke, E, Gelderblom, M, and Magnus, T. (2018). Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Therapeutic advances in neurological disorders* **11**, 1756286418774254. doi:
157. Liesz, A, Dalpke, A, Mracsko, E, Roth, S, Zhou, W, Yang, H, et al. (2015). DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *Journal of Neuroscience* **35**, 583-598. doi:
158. Schulze, J, Zierath, D, Tanzi, P, Cain, K, Shibata, D, Dressel, A, et al. (2013). Severe stroke induces long-lasting alterations of high-mobility group box 1. *Stroke* **44**, 246-248. doi:
159. Fitzgerald, KA, and Kagan, JC. (2020). Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* **180**, 1044-1066. doi:
160. Kawai, T, and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384. doi:
161. Caso, JR, Pradillo, JM, Hurtado, O, Lorenzo, P, Moro, MA, and Lizasoain, I. (2007). Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* **115**, 1599-1608. doi:
162. Urra, X, Cervera, A, Obach, V, Climent, N, Planas, AM, and Chamorro, A. (2009). Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke* **40**, 1262-1268. doi:

163. Zera, KA, and Buckwalter, MS. (2020). The local and peripheral immune responses to stroke: implications for therapeutic development. *Neurotherapeutics* **17**, 414-435. doi:
164. Berchtold, D, Priller, J, Meisel, C, and Meisel, A. (2020). Interaction of microglia with infiltrating immune cells in the different phases of stroke. *Brain Pathology* **30**, 1208-1218. doi:
165. Garcia-Culebras, A, Durán-Laforet, V, Peña-Martínez, C, Ballesteros, I, Pradillo, JM, Diaz-Guzman, J, et al. (2018). Myeloid cells as therapeutic targets in neuroinflammation after stroke: specific roles of neutrophils and neutrophil–platelet interactions. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **38**, 2150-2164. doi:
166. Parada, E, Casas, AI, Palomino-Antolin, A, Gómez-Rangel, V, Rubio-Navarro, A, Farré-Alins, V, et al. (2019). Early toll-like receptor 4 blockade reduces ROS and inflammation triggered by microglial pro-inflammatory phenotype in rodent and human brain ischaemia models. *British Journal of Pharmacology* **176**, 2764-2779. doi:
167. Hu, X, Li, P, Guo, Y, Wang, H, Leak, RK, Chen, S, et al. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063-3070. doi:
168. Lyu, J, Jiang, X, Leak, RK, Shi, Y, Hu, X, and Chen, J. (2021). Microglial responses to brain injury and disease: functional diversity and new opportunities. *Translational stroke research* **12**, 474-495. doi:
169. Iadecola, C, Buckwalter, MS, and Anrather, J. (2020). Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation* **130**, 2777-2788. doi:
170. Mastorakos, P, Mihelson, N, Luby, M, Burks, SR, Johnson, K, Hsia, AW, et al. (2021). Temporally distinct myeloid cell responses mediate damage and repair after cerebrovascular injury. *Nature neuroscience* **24**, 245-258. doi:
171. Villa, A, Klein, B, Janssen, B, Pedragosa, J, Pepe, G, Zinnhardt, B, et al. (2018). Identification of new molecular targets for PET imaging of the microglial anti-inflammatory activation state. *Theranostics* **8**, 5400. doi:
172. Cai, W, Dai, X, Chen, J, Zhao, J, Xu, M, Zhang, L, et al. (2019). STAT6/Arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *JCI insight* **4**doi:
173. Morris, RS, Simon Jones, P, Alawneh, JA, Hong, YT, Fryer, TD, Aigbirhio, FI, et al. (2018). Relationships between selective neuronal loss and microglial activation after ischaemic stroke in man. *Brain* **141**, 2098-2111. doi:
174. Gerhard, A, Schwarz, J, Myers, R, Wise, R, and Banati, RB. (2005). Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [¹¹C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* **24**, 591-595. doi:
175. Tan, Y-L, Yuan, Y, and Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry* **25**, 351-367. doi:
176. Uriarte Huarte, O, Richart, L, Mittelbronn, M, and Michelucci, A. (2021). Microglia in health and disease: the strength to be diverse and reactive. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **15**, 660523. doi:
177. Young, AM, Kumasaka, N, Calvert, F, Hammond, TR, Knights, A, Panousis, N, et al. (2021). A map of transcriptional heterogeneity and regulatory variation in human microglia. *Nature genetics* **53**, 861-868. doi:

178. Kanazawa, M, Ninomiya, I, Hatakeyama, M, Takahashi, T, and Shimohata, T. (2017). Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *International journal of molecular sciences* **18**, 2135. doi:
179. Cherry, J, Olschowka, J, and O'Banion, M. (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflamm* **11**: 98.
180. Durafourt, BA, Moore, CS, Zammit, DA, Johnson, TA, Zaguia, F, Guiot, MC, et al. (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* **60**, 717-727. doi:
181. Kigerl, KA, Gensel, JC, Ankeny, DP, Alexander, JK, Donnelly, DJ, and Popovich, PG. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience* **29**, 13435-13444. doi:
182. Ding, AH, Nathan, CF, and Stuehr, D. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology* **141**, 2407-2412. doi:
183. Zhao, S-c, Ma, L-s, Chu, Z-h, Xu, H, Wu, W-q, and Liu, F. (2017). Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacologica Sinica* **38**, 445-458. doi:
184. Zhao, S-c, Wang, C, Xu, H, Wu, W-q, Chu, Z-h, Ma, L-s, et al. (2017). Age-related differences in interferon regulatory factor-4 and-5 signaling in ischemic brains of mice. *Acta Pharmacologica Sinica* **38**, 1425-1434. doi:
185. Al Mamun, A, Chauhan, A, Yu, H, Xu, Y, Sharmeen, R, and Liu, F. (2018). Interferon regulatory factor 4/5 signaling impacts on microglial activation after ischemic stroke in mice. *European Journal of Neuroscience* **47**, 140-149. doi:
186. Eguchi, J, Kong, X, Tenta, M, Wang, X, Kang, S, and Rosen, ED. (2013). Interferon regulatory factor 4 regulates obesity-induced inflammation through regulation of adipose tissue macrophage polarization. *Diabetes* **62**, 3394-3403. doi:
187. Paun, A, Reinert, JT, Jiang, Z, Medin, C, Balkhi, MY, Fitzgerald, KA, et al. (2008). Functional characterization of murine interferon regulatory factor 5 (IRF-5) and its role in the innate antiviral response. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 14295-14308. doi:
188. Liu, Z, and Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Progress in neurobiology* **144**, 103-120. doi:
189. Ben Haim, L, Carrillo-de Sauvage, M-A, Ceyzériat, K, and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 278. doi:
190. Sofroniew, MV. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist* **11**, 400-407. doi:
191. Gill, D, Sivakumaran, P, Aravind, A, Tank, A, Dosh, R, and Veltkamp, R. (2018). Temporal trends in the levels of peripherally circulating leukocyte subtypes in the hours after ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* **27**, 198-202. doi:

192. Gelderblom, M, Leypoldt, F, Steinbach, K, Behrens, D, Choe, C-U, Siler, DA, et al. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* **40**, 1849-1857. doi:
193. Chen, C, Chu, S-F, Liu, D-D, Zhang, Z, Kong, L-L, Zhou, X, et al. (2018). Chemokines play complex roles in cerebral ischemia. *Neurochemistry international* **112**, 146-158. doi:
194. Chen, C, Chu, S-f, Zhang, Z, and Chen, N-h. (2020). CKLF1/CCR5 axis is involved in neutrophils migration of rats with transient cerebral ischemia. *International Immunopharmacology* **85**, 106577. doi:
195. Kovacs-Litman, A, and Vonderwalde, I. (2016). Monocyte-Derived Macrophages Modulate Inflammation and Promote Long-Term Functional Recovery in a Mouse Model of Ischemia. *Journal of Neuroscience* **36**, 9757-9759. doi:
196. Feng, Y, Liao, S, Wei, C, Jia, D, Wood, K, Liu, Q, et al. (2017). Infiltration and persistence of lymphocytes during late-stage cerebral ischemia in middle cerebral artery occlusion and photothrombotic stroke models. *Journal of neuroinflammation* **14**, 1-12. doi:
197. Chu, HX, Kim, HA, Lee, S, Moore, JP, Chan, CT, Vinh, A, et al. (2014). Immune cell infiltration in malignant middle cerebral artery infarction: comparison with transient cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **34**, 450-459. doi:
198. Zhang, Y, Gao, Z, Wang, D, Zhang, T, Sun, B, Mu, L, et al. (2014). Accumulation of natural killer cells in ischemic brain tissues and the chemotactic effect of IP-10. *Journal of neuroinflammation* **11**, 1-13. doi:
199. Li, P, Wang, L, Zhou, Y, Gan, Y, Zhu, W, Xia, Y, et al. (2017). C-C Chemokine Receptor type 5 (CCR 5)-mediated docking of transferred Tregs protects against early blood-brain barrier disruption after stroke. *Journal of the American Heart Association* **6**, e006387. doi:
200. Arunachalam, P, Ludewig, P, Melich, P, Arumugam, TV, Gerloff, C, Prinz, I, et al. (2017). CCR6 (CC Chemokine Receptor 6) is essential for the migration of detrimental natural interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in stroke. *Stroke* **48**, 1957-1965. doi:
201. Gan, Y, Liu, Q, Wu, W, Yin, J-X, Bai, X-F, Shen, R, et al. (2014). Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 2704-2709. doi:
202. Disorders, NIoN, and Group, Sr-PSS. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine* **333**, 1581-1588. doi:
203. Del Zoppo, GJ, Saver, JL, Jauch, EC, and Adams Jr, HP. (2009). Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **40**, 2945-2948. doi:
204. Hacke, W, Kaste, M, Bluhmki, E, Brozman, M, Dávalos, A, Guidetti, D, et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *New England journal of medicine* **359**, 1317-1329. doi:
205. Hacke, W, Kaste, M, Fieschi, C, Toni, D, Lesaffre, E, Von Kummer, R, et al. (1995). Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen

- activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *Jama* **274**, 1017-1025. doi:
206. Lyerly, MJ, Albright, KC, Boehme, AK, Shahripour, RB, Houston, JT, Rawal, PV, et al. (2013). The potential impact of maintaining a 3-hour IV thrombolysis window: how many more patients can we safely treat? *Journal of neurological disorders & stroke* **1**, 1015-1015. doi:
 207. Meyer, BC, Raman, R, Hemmen, T, Obler, R, Zivin, JA, Rao, R, et al. (2008). Efficacy of site-independent telemedicine in the STRokE DOC trial: a randomised, blinded, prospective study. *The Lancet Neurology* **7**, 787-795. doi:
 208. Barlinn, J, Gerber, J, Barlinn, K, Pallesen, L-P, Siepmann, T, Zerna, C, et al. (2017). Acute endovascular treatment delivery to ischemic stroke patients transferred within a telestroke network: a retrospective observational study. *International Journal of Stroke* **12**, 502-509. doi:
 209. Goyal, M, Menon, BK, van Zwam, WH, Dippel, DW, Mitchell, PJ, Demchuk, AM, et al. (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* **387**, 1723-1731. doi:
 210. McAdams, M. (2017) *Assessing the impact of care in a telemedicine-based stroke network using patient-centered health-related quality-of-life outcomes*, Morressier
 211. Pedragosa, À, Alvarez-Sabín, J, Rubiera, M, Rodriguez-Luna, D, Maisterra, O, Molina, C, et al. (2012). Impact of telemedicine on acute management of stroke patients undergoing endovascular procedures. *Cerebrovascular Diseases* **34**, 436-442. doi:
 212. Keplinger, J, Dzialowski, I, Barlinn, K, Puetz, V, Wojciechowski, C, Schneider, H, et al. (2014). Emergency transfer of acute stroke patients within the East Saxony telemedicine stroke network: a descriptive analysis. *International Journal of Stroke* **9**, 160-165. doi:
 213. Albers, GW, Marks, MP, Kemp, S, Christensen, S, Tsai, JP, Ortega-Gutierrez, S, et al. (2018). Thrombectomy for stroke at 6 to 16 hours with selection by perfusion imaging. *New England Journal of Medicine* **378**, 708-718. doi:
 214. Amy, Y, Zerna, C, Assis, Z, Holodinsky, JK, Randhawa, PA, Najm, M, et al. (2016). Multiphase CT angiography increases detection of anterior circulation intracranial occlusion. *Neurology* **87**, 609-616. doi:
 215. Hu, Q, Manaenko, A, Bian, H, Guo, Z, Huang, J-L, Guo, Z-N, et al. (2017). Hyperbaric oxygen reduces infarction volume and hemorrhagic transformation through ATP/NAD⁺/Sirt1 pathway in hyperglycemic middle cerebral artery occlusion rats. *Stroke* **48**, 1655-1664. doi:
 216. Singhal, AB, Dijkhuizen, RM, Rosen, BR, and Lo, EH. (2002). Normobaric hyperoxia reduces MRI diffusion abnormalities and infarct size in experimental stroke. *Neurology* **58**, 945-952. doi:
 217. Zhai, W-w, Sun, L, Yu, Z-q, and Chen, G. (2016). Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. *Medical Gas Research* **6**, 111. doi:

218. Calvert, JW, Zhou, C, and Zhang, JH. (2004). Transient exposure of rat pups to hyperoxia at normobaric and hyperbaric pressures does not cause retinopathy of prematurity. *Experimental neurology* **189**, 150-161. doi:
219. Chavko, M, Xing, G-Q, and Keyser, DO. (2001). Increased sensitivity to seizures in repeated exposures to hyperbaric oxygen: role of NOS activation. *Brain research* **900**, 227-233. doi:
220. Matchett, GA, Martin, RD, and Zhang, JH. (2009). Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms. *Neurological Research* **31**, 114-121. doi:
221. Liu, S, Shi, H, Liu, W, Furuichi, T, Timmins, GS, and Liu, KJ. (2004). Interstitial pO₂ in ischemic penumbra and core are differentially affected following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 343-349. doi: 10.1097/01.WCB.0000110047.43905.01.
222. Liu, S, Liu, W, Ding, W, Miyake, M, Rosenberg, GA, and Liu, KJ. (2006). Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**, 1274-1284. doi:
223. Shin, HK, Dunn, AK, Jones, PB, Boas, DA, Lo, EH, Moskowitz, MA, et al. (2007). Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain* **130**, 1631-1642. doi:
224. Cheng, Z, Li, F-W, Stone, CR, Elkin, K, Peng, C-Y, Bardhi, R, et al. (2021). Normobaric oxygen therapy attenuates hyperglycolysis in ischemic stroke. *Neural Regeneration Research* **16**, 1017. doi:
225. Beker, M, Caglayan, A, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. (2015) Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604–30614.
226. Wang, M, Geng, X, Dandu, C, Patel, R, and Ding, Y. (2021). Normobaric Oxygen (NBO) Therapy Reduces Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of Early Autophagy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**doi:
227. Takahashi, JS. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics* **18**, 164-179. doi:
228. Schroeder, AM, and Colwell, CS. (2013). How to fix a broken clock. *Trends in pharmacological sciences* **34**, 605-619. doi:
229. Buhr, ED, Yoo, S-H, and Takahashi, JS. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *science* **330**, 379-385. doi:
230. DeCoursey, PJ. (2014). Survival value of suprachiasmatic nuclei (SCN) in four wild sciurid rodents. *Behavioral neuroscience* **128**, 240. doi:
231. Hurd, MW, and Ralph, MR. (1998). The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *Journal of biological rhythms* **13**, 430-436. doi:
232. Bass, J, and Lazar, MA. (2016). Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* **354**, 994-999. doi:
233. Moore, RY, and Eichler, VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research* doi:

234. Liu, AC, Welsh, DK, Ko, CH, Tran, HG, Zhang, EE, Priest, AA, et al. (2007). Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* **129**, 605-616. doi:
235. Yamazaki, S, and Takahashi, JS. (2005) Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. In *Methods in enzymology* Vol. 393 pp. 288-301, Elsevier
236. Abe, M, Herzog, ED, Yamazaki, S, Straume, M, Tei, H, Sakaki, Y, et al. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *Journal of Neuroscience* **22**, 350-356. doi:
237. Mohawk, JA, Green, CB, and Takahashi, JS. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience* **35**, 445. doi:
238. Paschos, GK, and FitzGerald, GA. (2010). Circadian clocks and vascular function. *Circulation research* **106**, 833-841. doi:
239. Liu, AC, Lewis, WG, and Kay, SA. (2007). Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature chemical biology* **3**, 630-639. doi:
240. Ko, CH, and Takahashi, JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* **15**, R271-R277. doi:
241. Vitaterna, MH, King, DP, Chang, A-M, Kornhauser, JM, Lowrey, PL, McDonald, JD, et al. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719-725. doi:
242. Bunger, MK, Wilsbacher, LD, Moran, SM, Clendenin, C, Radcliffe, LA, Hogenesch, JB, et al. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009-1017. doi:
243. Yoo, S-H, Mohawk, JA, Sieppka, SM, Shan, Y, Huh, SK, Hong, H-K, et al. (2013). Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell* **152**, 1091-1105. doi:
244. Sieppka, SM, Yoo, S-H, Park, J, Song, W, Kumar, V, Hu, Y, et al. (2007). Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* **129**, 1011-1023. doi:
245. Gallego, M, and Virshup, DM. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**, 139-148. doi:
246. Preitner, N, Damiola, F, Zakany, J, Duboule, D, Albrecht, U, and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260. doi:
247. Ueda, HR, Chen, W, Adachi, A, Wakamatsu, H, Hayashi, S, Takasugi, T, et al. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* **418**, 534-539. doi:
248. Storch, K-F, Lipan, O, Leykin, I, Viswanathan, N, Davis, FC, Wong, WH, et al. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78-83. doi:
249. Panda, S, Antoch, MP, Miller, BH, Su, AI, Schook, AB, Straume, M, et al. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307-320. doi:
250. Zhang, R, Lahens, NF, Ballance, HI, Hughes, ME, and Hogenesch, JB. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for

- biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16219-16224. doi:
251. Mure, LS, Le, HD, Benegiamo, G, Chang, MW, Rios, L, Jillani, N, et al. (2018). Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* **359**, eaao0318. doi:
 252. Perelis, M, Marcheva, B, Moynihan Ramsey, K, Schipma, MJ, Hutchison, AL, Taguchi, A, et al. (2015). Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science* **350**, aac4250. doi:
 253. Qu, M, Duffy, T, Hirota, T, and Kay, SA. (2018). Nuclear receptor HNF4A transrepresses CLOCK: BMAL1 and modulates tissue-specific circadian networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E12305-E12312. doi:
 254. Papazyan, R, Zhang, Y, and Lazar, MA. (2016). Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription. *Nature structural & molecular biology* **23**, 1045-1052. doi:
 255. Yoo, S-H, Kojima, S, Shimomura, K, Koike, N, Buhr, ED, Furukawa, T, et al. (2017). Period2 3'-UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PERIOD2 protein accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E8855-E8864. doi:
 256. Green, CB. (2018). Circadian posttranscriptional regulatory mechanisms in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **10**, a030692. doi:
 257. Kobayashi, M, Morinibu, A, Koyasu, S, Goto, Y, Hiraoka, M, and Harada, H. (2017) A circadian clock gene, PER 2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes. Vol. 284 pp. 3804-3816, Wiley Online Library
 258. Estrada-Rojo, F, Morales-Gomez, J, Coballase-Urrutia, E, Martinez-Vargas, M, and Navarro, L. (2018). Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. *BMC Research Notes* **11**, 1-7. doi:
 259. Tischkau, SA, Cohen, JA, Stark, JT, Gross, DR, and Bottum, KM. (2007). Time-of-day affects expression of hippocampal markers for ischemic damage induced by global ischemia. *Experimental neurology* **208**, 314-322. doi:
 260. Xu, Y-Q, Zhang, D, Jin, T, Cai, D-J, Wu, Q, Lu, Y, et al. (2012). Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. doi:
 261. O'collins, VE, Macleod, MR, Cox, SF, Van Raay, L, Aleksoska, E, Donnan, GA, et al. (2011). Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **31**, 962-975. doi:
 262. Marquez de Prado, B, Castaneda, T, Galindo, A, Del Arco, A, Segovia, G, Reiter, R, et al. (2000). Melatonin disrupts circadian rhythms of glutamate and GABA in the neostriatum of the awake rat: a microdialysis study. *Journal of pineal research* **29**, 209-216. doi:
 263. Putker, M, and O'Neill, JS. (2016). Reciprocal control of the circadian clock and cellular redox state-a critical appraisal. *Molecules and cells* **39**, 6. doi:

264. Magnone, MC, Langmesser, S, Bezdek, AC, Tallone, T, Rusconi, S, and Albrecht, U. (2015). The mammalian circadian clock gene *per2* modulates cell death in response to oxidative stress. *Frontiers in Neurology* **5**, 289. doi:
265. Esposito, E, Li, W, T Mandeville, E, Park, J-H, Şencan, I, Guo, S, et al. (2020). Potential circadian effects on translational failure for neuroprotection. *Nature* **582**, 395-398. doi:
266. Musiek, ES, Lim, MM, Yang, G, Bauer, AQ, Qi, L, Lee, Y, et al. (2013). Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* **123**doi:
267. Wiebking, N, Maronde, E, and Rami, A. (2013). Increased neuronal injury in clock gene *Per-1* deficient-mice after cerebral ischemia. *Current neurovascular research* **10**, 112-125. doi:
268. Brancaccio, M, Patton, AP, Chesham, JE, Maywood, ES, and Hastings, MH. (2017). Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamatergic signaling. *Neuron* **93**, 1420-1435. e1425. doi:
269. Womac, AD, Burkeen, JF, Neuendorff, N, Earnest, DJ, and Zoran, MJ. (2009). Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes. *European Journal of Neuroscience* **30**, 869-876. doi:
270. Lananna, BV, Nadarajah, CJ, Izumo, M, Cedeño, MR, Xiong, DD, Dimitry, J, et al. (2018). Cell-autonomous regulation of astrocyte activation by the circadian clock protein BMAL1. *Cell reports* **25**, 1-9. e5. doi:
271. Bellesi, M, Pfister-Genskow, M, Maret, S, Keles, S, Tononi, G, and Cirelli, C. (2013). Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors. *Journal of Neuroscience* **33**, 14288-14300. doi:
272. Durgan, DJ, Crossland, RF, and Bryan Jr, RM. (2017). The rat cerebral vasculature exhibits time-of-day-dependent oscillations in circadian clock genes and vascular function that are attenuated following obstructive sleep apnea. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **37**, 2806-2819. doi:
273. Anea, CB, Cheng, B, Sharma, S, Kumar, S, Caldwell, RW, Yao, L, et al. (2012). Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of *Bmal1*-knockout mice. *Circulation research* **111**, 1157-1165. doi:
274. Cuddapah, VA, Zhang, SL, and Sehgal, A. (2019). Regulation of the blood–brain barrier by circadian rhythms and sleep. *Trends in neurosciences* **42**, 500-510. doi:
275. Zhang, SL, Yue, Z, Arnold, DM, Artiushin, G, and Sehgal, A. (2018). A circadian clock in the blood-brain barrier regulates xenobiotic efflux. *Cell* **173**, 130-139. e110. doi:
276. Nakazato, R, Kawabe, K, Yamada, D, Ikeno, S, Mieda, M, Shimba, S, et al. (2017). Disruption of *Bmal1* impairs blood–brain barrier integrity via pericyte dysfunction. *Journal of Neuroscience* **37**, 10052-10062. doi:
277. Hablitz, LM, Plá, V, Giannetto, M, Vinitzky, HS, Stæger, FF, Metcalfe, T, et al. (2020). Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nature communications* **11**, 1-11. doi:
278. Nilsson, C, Stahlberg, F, Thomsen, C, Henriksen, O, Harning, M, and Owman, C. (1992). Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging. *American Journal of*

- Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **262**, R20-R24. doi:
279. Esposito, E, Ahn, BJ, Shi, J, Nakamura, Y, Park, JH, Mandeville, ET, et al. (2019). Brain-to-cervical lymph node signaling after stroke. *Nature communications* **10**, 1-13. doi:
 280. Schallner, N, Lieberum, J-L, Gallo, D, LeBlanc III, RH, Fuller, PM, Hanafy, KA, et al. (2017). Carbon monoxide preserves circadian rhythm to reduce the severity of subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke* **48**, 2565-2573. doi:
 281. Giordano, KR, Denman, CR, Dollish, HK, Fernandez, F, Lifshitz, J, Akhter, M, et al. (2020). Intracerebral hemorrhage in the mouse altered sleep-wake patterns and activated microglia. *Experimental Neurology* **327**, 113242. doi:
 282. Malik, A, Kondratov, RV, Jamasbi, RJ, and Geusz, ME. (2015). Circadian clock genes are essential for normal adult neurogenesis, differentiation, and fate determination. *PLoS One* **10**, e0139655. doi:
 283. Rakai, BD, Chrusch, MJ, Spanswick, SC, Dyck, RH, and Antle, MC. (2014). Survival of adult generated hippocampal neurons is altered in circadian arrhythmic mice. *PloS one* **9**, e99527. doi:
 284. Jensen, L, and Cao, Y. (2013). Clock controls angiogenesis. *Cell Cycle* **12**, 405-408. doi:
 285. Koyanagi, S, Kuramoto, Y, Nakagawa, H, Aramaki, H, Ohdo, S, Soeda, S, et al. (2003). A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer research* **63**, 7277-7283. doi:
 286. Chun, LE, Woodruff, ER, Morton, S, Hinds, LR, and Spencer, RL. (2015). Variations in phase and amplitude of rhythmic clock gene expression across prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamic paraventricular and suprachiasmatic nuclei of male and female rats. *Journal of biological rhythms* **30**, 417-436. doi:
 287. Raghuram, S, Stayrook, KR, Huang, P, Rogers, PM, Nosie, AK, McClure, DB, et al. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nature structural & molecular biology* **14**, 1207-1213. doi:
 288. Balsalobre, A, Damiola, F, and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929-937. doi:
 289. Zvonic, S, Ptitsyn, AA, Conrad, SA, Scott, LK, Floyd, ZE, Kilroy, G, et al. (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* **55**, 962-970. doi:
 290. Torra, IsP, Tsibulsky, V, Delaunay, F, Saladin, Rg, Laudet, V, Fruchart, J-C, et al. (2000). Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb α expression in liver. *Endocrinology* **141**, 3799-3806. doi:
 291. Renaud, J-P, Harris, JM, Downes, M, Burke, LJ, and Muscat, GE. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Molecular Endocrinology* **14**, 700-717. doi:

292. Cho, H, Zhao, X, Hatori, M, Yu, RT, Barish, GD, Lam, MT, et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* **485**, 123-127. doi:
293. Bugge, A, Feng, D, Everett, LJ, Briggs, ER, Mullican, SE, Wang, F, et al. (2012). Rev-erb α and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes & development* **26**, 657-667. doi:
294. Jager, J, O'Brien, WT, Manlove, J, Krizman, EN, Fang, B, Gerhart-Hines, Z, et al. (2014). Behavioral changes and dopaminergic dysregulation in mice lacking the nuclear receptor Rev-erb α . *Molecular endocrinology* **28**, 490-498. doi:
295. Gerhart-Hines, Z, Feng, D, Emmett, MJ, Everett, LJ, Loro, E, Briggs, ER, et al. (2013). The nuclear receptor Rev-erb α controls circadian thermogenic plasticity. *Nature* **503**, 410-413. doi:
296. Woldt, E, Sebti, Y, Solt, LA, Duhem, C, Lancel, S, Eeckhoutte, J, et al. (2013). Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nature medicine* **19**, 1039-1046. doi:
297. Gibbs, JE, Blaikley, J, Beesley, S, Matthews, L, Simpson, KD, Boyce, SH, et al. (2012). The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 582-587. doi:
298. Feng, D, Liu, T, Sun, Z, Bugge, A, Mullican, SE, Alenghat, T, et al. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* **331**, 1315-1319. doi:
299. Rébé, C, Raveneau, M, Chevriaux, A, Lakomy, D, Sberna, A-L, Costa, A, et al. (2009). Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor α pathway increases the clearance of apoptotic cells by human Macrophages. *Circulation research* **105**, 393-401. doi:
300. Lam, MT, Cho, H, Lesch, HP, Gosselin, D, Heinz, S, Tanaka-Oishi, Y, et al. (2013). Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* **498**, 511-515. doi:
301. Chung, S, Lee, EJ, Yun, S, Choe, HK, Park, S-B, Son, HJ, et al. (2014). Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB α on midbrain dopamine production and mood regulation. *Cell* **157**, 858-868. doi:
302. Hong, H, Cheung, YM, Cao, X, Wu, Y, Li, C, and Tian, XY. (2021). REV-ERB α agonist SR9009 suppresses IL-1 β production in macrophages through BMAL1-dependent inhibition of inflammasome. *Biochemical pharmacology* **192**, 114701. doi:
303. Solt, LA, Wang, Y, Banerjee, S, Hughes, T, Kojetin, DJ, Lundasen, T, et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* **485**, 62-68. doi: 10.1038/nature11030.
304. Wang, S, Lin, Y, Yuan, X, Li, F, Guo, L, and Wu, B. (2018). REV-ERB α integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- κ B/NLRP3 axis. *Nature communications* **9**, 1-12. doi:
305. Wang, S, Kozai, M, Mita, H, Cai, Z, Masum, MA, Ichii, O, et al. (2021). REV-ERB agonist suppresses IL-17 production in $\gamma\delta$ T cells and improves psoriatic dermatitis in a mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **144**, 112283. doi:

306. Olefsky, JM, and Glass, CK. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology* **72**, 219-246. doi:
307. Sato, S, Sakurai, T, Ogasawara, J, Takahashi, M, Izawa, T, Imaizumi, K, et al. (2014). A circadian clock gene, Rev-erb α , modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *The Journal of Immunology* **192**, 407-417. doi:
308. Pariollaud, M, Gibbs, JE, Hopwood, TW, Brown, S, Begley, N, Vonslow, R, et al. (2018). Circadian clock component REV-ERB α controls homeostatic regulation of pulmonary inflammation. *The Journal of clinical investigation* **128**, 2281-2296. doi:
309. Benjamin, EJ, Muntner, P, Alonso, A, Bittencourt, MS, Callaway, CW, Carson, AP, et al. (2019). Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **139**, e56-e528. doi:
310. Members, WG, Thom, T, Haase, N, Rosamond, W, Howard, VJ, Rumsfeld, J, et al. (2006). Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **113**, e85-e151. doi:
311. Beker, MC, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. (2015). Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604-30614. doi: 10.18632/oncotarget.5773.
312. Kilic, E, Kilic, U, Wang, Y, Bassetti, CL, Marti, HH, and Hermann, DM. (2006). The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB journal* **20**, 1185. doi:
313. Bieber, M, Gronewold, J, Scharf, A-C, Schuhmann, MK, Langhauser, F, Hopp, S, et al. (2019). Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **50**, 2875-2882. doi:
314. Caglayan, AB, Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, A, Yulug, B, et al. (2019). Acute and post-acute neuromodulation induces stroke recovery by promoting survival signaling, neurogenesis, and pyramidal tract plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience* **13**, 144. doi:
315. Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Gunal, MY, Caglayan, B, Yalcin, E, et al. (2017). Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox biology* **12**, 657-665. doi:
316. Yang, C, Hawkins, KE, Doré, S, and Candelario-Jalil, E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **316**, C135-C153. doi:
317. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, Ü, Caglayan, AB, Beker, MC, Kelestemur, T, et al. (2014). HMG-CoA reductase inhibition promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 422. doi:
318. Yalcin, E, Beker, MC, Turkseven, S, Caglayan, B, Gurel, B, Kilic, U, et al. (2019). Evidence that melatonin downregulates Nedd4-1 E3 ligase and its role in cellular survival. *Toxicology and applied pharmacology* **379**, 114686. doi:

319. Musuka, TD, Wilton, SB, Traboulsi, M, and Hill, MD. (2015). Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *Cmaj* **187**, 887-893. doi:
320. Liu, D, Nanclares, C, Simbriger, K, Fang, K, Lorsung, E, Le, N, et al. (2022). Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Bmal1 mutant mice ameliorated by mTORC1 inhibition. *Molecular psychiatry*, 1-12. doi:
321. Landgraf, D, Long, JE, Proulx, CD, Barandas, R, Malinow, R, and Welsh, DK. (2016). Genetic disruption of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus causes helplessness, behavioral despair, and anxiety-like behavior in mice. *Biological psychiatry* **80**, 827-835. doi:
322. Lavebratt, C, Sjöholm, LK, Partonen, T, Schalling, M, and Forsell, Y. (2010). PER2 variant is associated with depression vulnerability. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **153**, 570-581. doi:
323. Russell, AL, Miller, L, Yi, H, Keil, R, Handa, RJ, and Wu, TJ. (2021). Knockout of the circadian gene, Per2, disrupts corticosterone secretion and results in depressive-like behaviors and deficits in startle responses. *BMC neuroscience* **22**, 1-11. doi:
324. Solt, LA, Wang, Y, Banerjee, S, Hughes, T, Kojetin, DJ, Lundasen, T, et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* **485**, 62-68. doi:
325. Leigh, R, Jen, SS, Hillis, AE, Krakauer, JW, Barker, PB, Albers, GW, et al. (2014). Pretreatment blood-brain barrier damage and post-treatment intracranial hemorrhage in patients receiving intravenous tissue-type plasminogen activator. *Stroke* **45**, 2030-2035. doi:
326. Leigh, R, Christensen, S, Campbell, BC, Marks, MP, Albers, GW, Lansberg, MG, et al. (2016). Pretreatment blood-brain barrier disruption and post-endovascular intracranial hemorrhage. *Neurology* **87**, 263-269. doi:
327. Jiang, X, Andjelkovic, AV, Zhu, L, Yang, T, Bennett, MV, Chen, J, et al. (2018). Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in neurobiology* **163**, 144-171. doi:
328. Pedragosa, J, Miró-Mur, F, Otxoa-de-Amezaga, A, Justicia, C, Ruíz-Jaén, F, Ponsaerts, P, et al. (2020). CCR2 deficiency in monocytes impairs angiogenesis and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **40**, S98-S116. doi:
329. Fang, W, Zhai, X, Han, D, Xiong, X, Wang, T, Zeng, X, et al. (2018). CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice. *Theranostics* **8**, 3530. doi:
330. Rochefort, NL, and Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports* **13**, 699-708. doi:
331. Brown, CE, Wong, C, and Murphy, TH. (2008). Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke* **39**, 1286-1291. doi:
332. Ji, Y, Koch, D, González Delgado, J, Günther, M, Witte, OW, Kessels, MM, et al. (2021). Poststroke dendritic arbor regrowth requires the actin nucleator Cobl. *PLoS biology* **19**, e3001399. doi:
333. Wu, F, Catano, M, Echeverry, R, Torre, E, Haile, WB, An, J, et al. (2014). Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and

- improves neurological outcome following ischemic stroke. *Journal of Neuroscience* **34**, 14219-14232. doi:
334. Brown, CE, Li, P, Boyd, JD, Delaney, KR, and Murphy, TH. (2007). Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *Journal of Neuroscience* **27**, 4101-4109. doi:
 335. Jedlicka, P, and Deller, T. (2017). Understanding the role of synaptopodin and the spine apparatus in Hebbian synaptic plasticity—New perspectives and the need for computational modeling. *Neurobiology of learning and memory* **138**, 21-30. doi:
 336. Segal, M, Vlachos, A, and Korkotian, E. (2010). The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *The Neuroscientist* **16**, 125-131. doi:
 337. Okubo-Suzuki, R, Okada, D, Sekiguchi, M, and Inokuchi, K. (2008). Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* **38**, 266-276. doi:
 338. Araki, Y, Zeng, M, Zhang, M, and Haganir, RL. (2015). Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. *Neuron* **85**, 173-189. doi:
 339. Komiyama, NH, Watabe, AM, Carlisle, HJ, Porter, K, Charlesworth, P, Monti, J, et al. (2002). SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *Journal of Neuroscience* **22**, 9721-9732. doi:
 340. Yang, H, Liu, Z, Liu, X, Cao, X, Chen, M, Lou, S, et al. (2022). Tat-SynGAP improves angiogenesis and post-stroke recovery by inhibiting MST1/JNK signaling. *Brain Research Bulletin* **180**, 38-45. doi:
 341. Bi, M, Gladbach, A, Van Eersel, J, Ittner, A, Przybyla, M, Van Hummel, A, et al. (2017). Tau exacerbates excitotoxic brain damage in an animal model of stroke. *Nature communications* **8**, 1-15. doi:
 342. Shi, X, Luo, L, Wang, J, Shen, H, Li, Y, Mamtilahun, M, et al. (2021). Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice. *Nature Communications* **12**, 1-19. doi:
 343. Whitfield, DR, Vallortigara, J, Alghamdi, A, Howlett, D, Hortobágyi, T, Johnson, M, et al. (2014). Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: association with cognitive impairment. *Neurobiology of aging* **35**, 2836-2844. doi:
 344. Dore, K, Carrico, Z, Alfonso, S, Marino, M, Koymans, K, Kessels, HW, et al. (2021). PSD-95 protects synapses from β -amyloid. *Cell reports* **35**, 109194. doi:
 345. Cook, DJ, Teves, L, and Tymianski, M. (2012). Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* **483**, 213-217. doi:

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
05/02/2020	17		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Rev-Erba ve Rev-Erbβ'nın Akut Beyin Hasarı Sonrası Rolünün İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.03.2020 – 01/03/2022

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	