



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**LİTYUMUN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ VE BU ETKİDE
HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİM YOLAKLARININ ROLLERİNİN
İNCELENMESİ**

NİLAY ATEŞ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji
Tez Sahibi : Nilay ATEŞ
Tez Başlığı : Lityumun nöroprotektif etkisi ve bu etkide hücre içi sinyal iletim
yolaklarının rollerinin incelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 01.03.2022

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

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ	İstanbul Medipol Üniversitesi	

Sınav Jüri Üyeleri

Doc.Dr Mustafa GÜZEL	İstanbul Medipol Üniversitesi
Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL	İstanbul Medipol Üniversitesi
Prof.Dr. FEYZA ARICIOĞLU	Marmara Üniversitesi
Prof.Dr. Hanefi ÖZBEK	İzmir Bakırçay 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 Müdür Vekili

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.

Nilay ATEŞ

İTHAF

‘‘Bu tez kıymetli annem Özlem Ateş ve kıymetli babam Bekir Taner Ateş’e ithaf edilmiştir.’’

TEŞEKKÜR

Çalışmalarının ve ekibinin önce hayranı olduğum ve daha sonra bu ekibin içerisinde yer almama fırsat veren çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a değerli bilgisini, tecrübelerini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemediği için, daima beni destekleyip motive ettiği için ve bizlere aile sıcaklığında çalışma ortamı sunduğu için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam ve doktora sürecimde bilgi ve deneyimleriyle yönlendirmelerde bulunan Prof. Dr. Hanefi Özbek ve Dr. Öğr. Üye. Arzu Şakul'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım da dahil olmak üzere tüm bilimsel çalışmalarım da daima destek olan, hiçbir sorunu ve sorunumu geri çevirmeden çözen Dr. Öğr. Üye. Ahmet Burak Çağlayan, Dr. Öğr. Üye. Mustafa Çağlar Beker ve Dr. Öğr. Üye. Taha Keleştemur'a çok teşekkür ederim. Labaratuarda bana yalnızca çalışma arkadaşı değil aynı zamanda ömürlük dost olan kıymetli Dr. Öğr. Üye. Reyhan Zeynep Gündoğdu Özdemir, Aysun Çağlayan ve Elif Sertel'e ve ayrıca Kılıç Lab'ın tüm üyelerine gönülden teşekkür ederim.

Başta başvurduğum her konuda yardımcı olan Büşra Batgi olmak üzere İstanbul Medipol Üniversitesi REMER ailesine ve MEDİTAM ailesine çalışmalarımıza yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Kendimi çocukları olarak dünyaya geldiğim her gün şanslı hissettiğim canım annem Özlem Ateş, canım babam Bekir Taner Ateş ve biricik kardeşim Hasan Ateş'e sevgi ve desteklerini her zaman hissettirdikleri için; Ateş ailesinin tüm bireyelerine bana ve yaptığım işe her zaman inandıkları için en derin teşekkürlerimi sunarım.

Daima yanımda olan eşim Osman Emre Özsoy'a beni desteklediği için en kalbi dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
1-ÖZET	1
2-ABSTRACT	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ	3
4-GENEL BİLGİLER	4
4.1. Beyin felci	4
4.2. Hücre ölümü.....	5
4.2.1. Apoptoz	6
4.3. İnflamasyon.....	6
4.4. Oksidatif Stres	7
4.5. Mitokondriyal Disfonksiyon	8
4.6. Ekzitotoksisite	9
4.7. Lityum	10
4.7.1. Lityum farmakokinetiği.....	12
4.7.2. Lityumun nörofarmakokinetiği	13
5-MATERYAL VE METOT	15
5.1. Deney Grupları Ve Dizaynı.....	15
5.2. Beyin Kan Akımının Ölçülmesi.....	17
5.3. Orta Serebral Arter Oklüzyonu Modeli.....	18
5.4. Lityumun Hazırlanması Ve Enjeksiyonu	19
5.5. Wortmannin Ve PD98059 Hazırlanması Ve Enjeksiyonu.....	19

5.6.	Nörolojik Defisit Ölçümü.....	19
5.7.	Beyinden Örnek Alınması.....	20
5.8.	Cresyl Violet Boyaması	20
5.9.	Kan-beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İmmunoglobulin G Boyamasıyla İncelenmesi	21
5.10.	In-sitü Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) İle DNA Kırıklarının Belirlenmesi	21
5.11.	NeUN Boyaması İle Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi	22
5.12.	GFAP Boyaması İle Glial Hücrelerin Değerlendirilmesi	22
5.13.	Protein Analizlerinin Yapılması.....	23
5.13.1.	Protein izolasyonu	23
5.13.2.	Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi	23
5.13.3.	Western blot	24
5.13.4.	Stripleme	26
5.13.5.	Değerlendirme.....	26
5.14.	İstatistik	26
6-BULGULAR	28
6.1.	90 Dakikalık OSA Tıkanması Kan Akımı Kaydı.....	28
6.2.	Nörolojik Hasar Skoru	29
6.3.	Hasar Hacmi Ve Beyin Ödemi Analizi	30
6.4.	Kan-Beyin Bariyer Geçirgenliği Analizi.....	32
6.5.	30 Dakikalık OSA Tıkanması Kan Akımı Kaydı.....	33
6.6.	30 Dakikalık OSA Tıkanması DNA Fragmantasyonu Analizi	34
6.7.	30 Dakikalık OSA Tıkanması Nöronal Sağkalım Analizi	35
6.8.	30 Dakikalık OSA Tıkanması Western Blot Sonuçları.....	36
6.8.1.	β -Aktin protein analizi	36
6.8.2.	P-Akt protein analizi	37
6.8.3.	p-ERK1/2 protein analizi	38
6.8.4.	p-GSK3 α/β protein analizi.....	39
6.8.5.	P-p38 protein analizi	40
6.8.6.	P-JNK protein analizi	41
6.8.7.	Bcl-xL, Bax ve Bcl-xL/Bax protein analizi.	42
6.8.8.	MMP-9 protein analizi	45

6.8.9. iNOS protein analizi.....	46
6.8.10. nNOS protein analizi.....	47
6.8.11. eNOS protein analizi.....	48
6.9. İnhibitör Uygulanan Grupların 30 dakika OSA tıkanması kan akımı kaydı	49
6.10. İnhibitör Uygulanan Grupların Western Blot Sonuçları.....	50
6.10.1. Wortmannin gruplarında p-Akt analizi.....	50
6.10.2. PD98059 gruplarında p-ERK1/2 analizi.....	51
6.11. İnhibitör Uygulanan Gruplarda DNA Fragmantasyonu Analizi.....	52
6.10.1. Wortmannin gruplarında TUNEL (+) hücreler.....	52
6.10.2. PD98059 gruplarında TUNEL (+) hücreler.....	53
6.12. İnhibitör Uygulanan Gruplarda Nöronal Sağkalım Analizi.....	54
6.12.1. Wortmannin gruplarında NeUN (+) hücreler.....	54
6.12.2. PD98059 gruplarında NeUN (+) hücreler.....	55
6.13. İnhibitör Uygulanan Gruplarda Glial Hücre Analizi.....	56
6.13.1. Wortmannin gruplarında GFAP (+) hücreler.....	56
6.13.2. PD98059 gruplarında GFAP (+) hücreler.....	57
7-TARTIŞMA.....	59
8-SONUÇ.....	68
9-KAYNAKLAR.....	69
10-ETİK KURUL ONAYI.....	82
11-ÖZGEÇMİŞ.....	85

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATP	Adenozin Trifosfat
AVM	Arteriovenöz Malformasyon
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FDA	Food and Drug Administration
GSK	Glikojen Sentez Kinaz
IgG	Immunoglobulin G
IL-1β	İnterlökin 1- β
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinaz
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
LDF	Lazer Doppler Akımı
MAPK	Mitojenle Aktive Olabilen Protein Kinaz
MMP-9	Matris Metallopeptidaz 9
NGS	Normal Keçi Serum
NMDA	N-metil D-aspartat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
OSAO	Orta Serebral Arter Oklüzyonu
PBS	Fosfatlanmış Tampon Solüsyonu
PFA	Paraformaldehit
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTPA	Rekombinant Doku Plazminojen Aktivatörü

TNF α Tumor Nekrozis Faktör

SAPK Stresle Aktive Olan Protein Kinaz



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.....	15
Şekil 5.2.1. Anlık kan akımı ölçüm bölgesi.....	17
Şekil 5.3.1. Orta serebral arterin tıkanması modeli	18
Şekil 6.1.1. 90 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı	28
Şekil 6.2.1. Nörolojik hasar skorlaması.....	29
Şekil 6.3.1.(A) Cresyl violet boyaması ile hasar hacmi ölçümü (B) sitotoksik ödem hesaplaması.....	30
Şekil 6.4.1.Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin iskemik striatum (A) ve korteks (B) seviyesinde IgG boyaması ile değerlendirilmesi	32
Şekil 6.5.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı	33
Şekil 6.6.1.TUNEL boyaması ile apoptoz değerlendirmesi	34
Şekil 6.7.1.NeUN boyaması ile nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.....	35
Şekil 6.8.1.1. β -Aktin protein seviyesi	36
Şekil 6.8.2.1. P-Akt protein seviyesi	37
Şekil 6.8.3.1. P-ERK1/2 protein seviyesi	38
Şekil 6.8.4.1. P-GSK-3 α / β protein seviyesi	39
Şekil 6.8.5.1. P-p38 protein seviyesi	40
Şekil 6.8.6.1. P-JNK protein seviyesi.....	41
Şekil 6.8.7.1. Bcl-xL protein seviyesi.....	42
Şekil 6.8.7.2. Bax protein seviyesi	43
Şekil 6.8.7.3. Bcl-xL/Bax oranı	44
Şekil 6.8.8.1. MMP-9 protein seviyesi	45
Şekil 6.8.9.1. iNOS protein seviyesi	46
Şekil 6.8.10.1. nNOS protein seviyesi.....	47
Şekil 6.8.11.1. eNOS protein seviyesi	48
Şekil 6.9.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı	49
Şekil 6.10.1.1. P-Akt protein seviyesi	50
Şekil 6.10.2.1. P-ERK1/2 protein seviyesi	51
Şekil 6.11.1.1. TUNEL boyaması ile Wortmannin uygulamasında apoptozun değerlendirilmesi.....	52

Şekil 6.11.2.1. TUNEL boyaması ile PD98059 uygulamasında apoptozun değerlendirilmesi.....	53
Şekil 6.12.1.1. Wortmannin grubunda nöronal sağkalım analizi	54
Şekil 6.12.2.1. PD98059 grubunda nöronal sağkalım analizi.....	55
Şekil 6.13.1.1. Wortmannin grubunda glial hücre analizi	56
Şekil 6.13.2.1. PD98059 grubunda glial hücre analizi	57



RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.7.1. Cryostat cihazı	20
Resim 5.12.1. Homojenizatör	23
Resim 5.12.2.1. Qubit cihazı	24
Resim 5.12.3.1. Transfer cihazı	25
Resim 5.12.3.2. Görüntüleme sistemi	26



1.ÖZET

LİTYUMUN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ VE BU ETKİDE HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİM YOLAKLARININ ROLLERİNİN İNCELENMESİ

Beyin felci dünyada ölüm nedenleri bakımından ikinci sırada, kalıcı hasar bakımından ise birinci sırada yer alan önemli bir hastalıktır. Son derece önemli bir hastalık olan beyin felci tedavisine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. Esas olarak bipolar duygudurum bozukluğunun tedavisinde kullanılan lityum serebral iskemi dahil çeşitli nörodejeneratif hastalıklar üzerine nöroprotektif etki göstermektedir. Beyin felci üzerine yapılan çalışmalarda lityumun enfarktüs alanını azalttığı ve davranış bozukluklarını hafiflettiği görülmüştür. Lityum aracılı nöroprotektif etkinin moleküler mekanizmaları karmaşıktır ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tezde lityumun beyin felci sonrası oluşan hasar üzerine etkilerinin ve etki mekanizmasının açıklanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla farelere 30 veya 90 dakikalık orta serebral arterin oklüzyonu uygulandı ve lityumun nörolojik defisit, enfarktüs hacmi, beyin ödemi azalttığı ve kan-beyin bariyeri bütünlüğünü koruduğu gösterildi. Ayrıca lityumun nöronal hasarı azalttığı görüldü ve sinyal iletim yolları üzerindeki etkileri değerlendirildi. OSAO'dan sonra Akt ve ERK'ların lityum tedavisiyle fosforilasyonlarının arttığı bu tezde gösterildi. Sırasıyla Wortmannin ve PD98059 kullanarak iki sağ kalım kinazının fosforilasyonu inhibe edildi. Lityum tedavisi ile azalan apoptozun ve artan nöronal sağkalımın, PI3K/Akt kinazın fosforilasyonunun inhibe edilmesiyle tersine döndüğü görüldü. Bununla birlikte ERK'ların inhibisyonu lityumun apoptotik hücre ölümü ve nöronal sağkalıma olan etkisinde bir değişiklik göstermediği görüldü. Verilerimiz, Akt fosforilasyonunun lityumun nöroprotektif aktivitesine aracılık ettiğini ve inhibe olan Akt fosforilasyonunun apoptotik hücre ölümüne yol açtığını desteklemektedir. Elde edilen bu bulgularla özellikle beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıklarından tedavisinde yeni yöntem ve hedeflerin araştırılmasına ve bulunmasına katkıda bulunması beklenmektedir. Bu çalışma Experimental Neurology dergisinin 351. sayısında yayımlanmıştır.

Anahtar kelimeler; Fokal serebral iskemi, lityum, nöroproteksiyon, PI3K inhibisyonu, PI3K/Akt sinyal yolağı

2.ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF LITHIUM AND THE ROLES OF INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

Stroke is the second leading cause of death and first in terms of permanent damage in the world. Studies on the treatment of stroke, which is an extremely important and effective disease, and to enlighten its mechanism continue today. Lithium, which is mainly used in the basic treatment of bipolar mood disorder, has a neuroprotective effect on various neurodegenerative diseases, including cerebral ischemia. Studies on stroke have shown that lithium reduces the infarct area and alleviates behavioral disorders. The molecular mechanisms of lithium-mediated neuroprotective action in the brain are complex and needs to be investigated. In this thesis, it is aimed to explain the mechanism of action by examining the effects of lithium on damage after focal cerebral ischemia. For this purpose, mouse was subjected 30 or 90 minutes of the middle cerebral artery occlusion and lithium was shown to reduce neurological deficit, infarct volume, brain edema and blood-brain barrier permeability. In addition, lithium reduced neuronal damage and its effects on signalling pathways were evaluated. It was shown in this thesis that the phosphorylation of Akt and ERKs increased with lithium treatment after OSAO. Phosphorylation of two survival kinases was inhibited using Wortmannin and PD98059, respectively. Decreased apoptosis and increased neuronal survival with lithium treatment observed to be reversed by inhibiting phosphorylation of PI3K/Akt kinase. However, inhibition of ERKs did not show any change in the effect of lithium on apoptotic cell death and neuronal survival. Our data support that Akt phosphorylation mediates the neuroprotective activity of lithium and that inhibited Akt phosphorylation leads to apoptotic cell death. With these findings, it is expected to contribute to the research and discovery of new methods and targets in the treatment of neurodegenerative diseases such as cerebral ischemia.

Keywords; Focal cerebral ischemia, lithium, neuroprotection, PI3K inhibition, PI3K/Akt signalling pathway

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin felci dünyada ölüm nedenleri bakımından kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada gelen nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. Her üç vakadan biri ölüm ile sonlanırken hayatta kalanlar ise yaşamlarını ciddi nörolojik hasarlarla geçirmek zorunda kalmaktadır. Beyin felcinin ilk 4,5 saat gibi kısıtlı bir sürede uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü (tPA) haricinde bilinen herhangi bir tedavisi bulunmamaktadır [2]. Yapılan deneysel beyin felci çalışmaları sonrası birçok klinik çalışma da başarısızlıkla sonuçlanmıştır [3]. Bu bağlamda özellikle farmakolojik ajan bazlı yeni tedavi seçenek ve stratejilerinin geliştirilmesi önemli bir gerekliliktir.

Serebral iske mi-reperfüzyon hasarı beyne giden kan akımının kesilmesiyle beyinde glikoz ve oksijen eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan patafizyolojik bir süreçtir [4]. Mutlak mekanizması belirsiz olmasına rağmen, enerji metabolizmasındaki bozukluklar ve oksidatif stres dahil olmak üzere bir dizi patolojik süreç nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne yol açarak nöronal hasara sebep olmaktadır [5-7]. Depresyon tedavisi için yaygın olarak kullanılan lityumun hem *in vitro* hem *in vivo* olarak nöronal hücreler üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [8].

Bu tez *in vivo* koşullarda gerçekleşen iskemik beyin hasarı sonrası nörolojik fonksiyon bozuklukları, iskemik hasar ve ödem, kan-beyin bariyeri bütünlüğünün bozulması, apoptotik hücre ölümü ve buna bağlı sinyal iletim yollarına lityumun etki mekanizmasını incelemek için tasarlanmıştır. Hasar sonrası lityumun nöronal sağkalım ve bunu destekleyen sinyal iletim yolak proteinleri üzerine etkileri incelenerek lityum aracılı etkinin iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Bu mekanizmaların incelenmesi için insanlarda da beyin felci vakalarının yaklaşık olarak %80'ini oluşturan orta serebral arterin tıkanması modeli kullanılmıştır. Bu modelin klinik vakalarla benzerlik göstermesinden dolayı elde edilen bulguların beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların yeni tedavi stratejileri ve hedef moleküllerinin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Beyin Felci

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre beyin felci dünyada ölüm nedeni bakımından ikinci sırada yer alan nörodejeneratif bir hastalıktır. Her yıl yaklaşık 15 milyon insan beyin felci geçirmekte ve 6,7 milyon [9] insan bu sebeple hayatını kaybetmektedir. Hayatta kalanlar ise kalıcı hasarlarla devam etmektedirler [10]. Beyin felci iki kategoride sınıflandırılabilir; iskemik (popülasyonun %87'si) ve hemorajik (popülasyonun %23'ü) [16]. Hemorajik inme anevrizma, arteriovenöz malformasyon (AVM) ya da beyin kan damarı duvarlarının zayıflaması ile karakterizedir. Tedavi edilmemiş hipertansiyon ve yaşlanmış kan damarları hemorajik inme için en önemli risk faktörleridir [11]. Ek olarak hemorajik inme kafa içi basıncını yükselterek ciddi beyin hasarına neden olmakta yüksek morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır[12] Hemorajik inme intraserebral ve subaraknoid hemoraj olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. İntraserebral hemoraj beyin parenkimasında görülürken subaraknoid hemoraj çoğunlukla pial ve araknoid boşlukta görülmektedir [13, 14].

İskemik beyin felci, beyne giden kan akımının damarların kan pıhtısı/trombüs ile kalıcı veya geçici tıkanmasıyla azalması sonucu gerçekleşir ve beyin felci vakalarının %87'sini oluşturmaktadır [15, 16]. İnternal karotid arterin en büyük dalı olan orta serebral arter (OSA), beynin temporal ve paryetal lobunun frontal ve lateral yüzeyi dahil olmak üzere beynin birincil motor, duyu ve konuşma alanlarına oksijen ve glikoz sağlayan ve iskemik inmenin en yaygın gerçekleştiği bölgedir. Bu nedenle, orta serebral arter tıkanıklığı olan hastalar hemiparezi veya monoparezi, hemisensör ve görsel eksiklikler, dizartri ve ataksiden muzdariptir [17]. Beyin felci tedavisinde öncelikli ilk yaklaşım mümkün olduğunca en hızlı şekilde iskemik alana giden kan akımının restore edilmesi ve oksijen beslemesinin sağlanmasıdır. Ancak tıkalı olan beyin damarının açılması patolojik olayların başlamasıyla potansiyel geri döndürülemez reperfüzyon hasarının oluşmasına sebep olmaktadır [18, 19]. İskemik beyin hasarı sonrası eksitotoksikite, peri-infarkt depolarizasyon, inflamasyon ve apoptoz gibi kompleks patofizyolojik olaylar gerçekleşmektedir [15]Bu bağlamda beyin felcinin FDA (Food and Drug Administration) onaylı bilinen tek tedavisi rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rtPA) tedavisidir. Ancak rtPA tedavisinin,

4,5 saatlik dar bir terapötik uygulanma aralığı ve hemoraji riski gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu sebeple akut inme vakalarının yalnızca %4-7'sinde kullanılabilir [20].

Akut iskemik inme sonrası beyinde kor [21] ve penumbra olmak üzere iki yangı bölgesi oluşmaktadır. Bunlardan ilki beyin kan akımının kesilmesi sonucu nöronlara giden oksijen ve glikozun azalmasıyla yangının hızlı olduğu kor bölgesidir. İkincil hasar (penumbra) iskemik alana gelen kan akımının restorasyonu ile başlamaktadır [22]. Reperfüzyon ile bölge oksijenlenmeye başlamakta ve bunun sonucu olarak da aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) ve/veya peroksinitrit oluşumu ve immün sistemin aktivasyonu görülmektedir [18, 23-30]. İskemi sonucu nöroinflamasyon için infiltre olan immün hücreler birden fazla immün ve glia hücrelerini çalıştırmak için inflamatuvar mediyatörlerini serbest bırakmaktadır. Bu immunreaktif hücreler hasarı sınırlandırmakta ve doku bütünlüğünü eski haline getirmeye çalışmaktadır [31, 32]. Bununla birlikte serebral iskemi sonrası aşırı mikroglia aktivasyonu meydana gelmektedir bu da KBB bozukluğunun bir sonucu olarak pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasına sebep olmaktadır [33-35]. Pro-inflamatuvar sitokinler nörotoksik molekülleri, serbest oksijen radikallerini (ROS), reaktif nitrojen türlerini (RNS), siklooksijenaz-2 ve indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) arttırarak sekonder nöronal hücre ölümüne sebep olmaktadır. İskemi sonrası gelişen ikinci faz iskemik alanın yayılmasına sebep olurken uzun vadede dokunun rejenerasyonunu başlatmaktadır [34, 36-41].

4.2.Hücre ölümü

İskemini başlangıcına ve ciddiyetine bağlı olarak hücre ölümü nekroz, apoptoz, otofaji, onkoz, nekroptoz gibi birçok mekanizma tarafından indüklenmektedir [42]. Nekroz esas olarak oksijen ve glikoz eksikliği/yokluğunun bir sonucu olarak iskemik kor bölgesinde görülmektedir. Apoptoz ise belirli seviyelerde oksijen ve glikozun kaldığı iskemik penumbra da meydana gelmektedir [43]. İki olay arasındaki fark mekanizmaların meydana geldiği zaman aralığındadır. Nekroz iskemi sonrası ilk dakikalarda görülürken apoptoz saatler veya günler sonra gelişmektedir. Nekrozdan farklı olarak apoptoz, plazma zarının bütünlüğünü ve yeterli miktarda ATP

gerektirmektedir [44]. Kor bölgesindeki nekrozla penumbradaki apoptoz arasındaki dikotomi kesin değildir çünkü her ikisinin de gerçekleşmesi iki bölgede de gösterilmektedir [45].

4.2.1. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, iskemik inmenin patolojik mekanizmasında ve patogeneğinde yer almaktadır. Yaygın olarak hücre gelişiminin aktivasyonu ve fizyolojik hücre döngüsünde rol oynamaktadır fakat aynı zamanda çevresel uyarım sonucu patolojik hasara katkıda bulunarak iskemik hasara yol açmaktadır [46-50].

Genel olarak apoptoz iç ve dış yollar olmak üzere iki yol ile aktifleştirilmektedir. Dış yolak, hücre yüzeyinde bulunan ligand ile aktive edilen ölüm reseptörleri tarafından başlatılmaktadır [51] Diğer bir yol olan iç apoptotik yolak ise oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve yüksek Ca^{+2} seviyeleri gibi bütün mekanizmalarla aktifleştirilebilmektedir. İyonik dengesizlik, mitokondriyal şişme veya mitokondriyal dış zarda bir gözenek oluşumu nedeniyle salınan sitokrom C bu tip apoptozda önemli bir rol oynamaktadır [52]. Nöronlarda, miyoblastlarda ve osteoblastlarda sitotoksikite ve oksidatif stres hasarıyla gelişebilen apoptoz PI3K-Akt/mTOR, mitojenle aktive olabilen protein kinaz (MAPK) ve endoplazmik retikulum stresini regüle eden sinyal yollarıyla yakından ilişkilidir.[19, 53-56] .

4.3. İnflamasyon

İskemik inme neticesinde beynin yetersiz kanlanması eksitotoksik hücre ölümüne, oksidatif strese ve inflamasyona yol açmaktadır. İnflamasyon süreci, serebral iske mi sonrası beyin hasarının önemli katılımcılarından biri sayılmaktadır [57]. İske mi sonrası oluşan primer hasara kıyasla inflamasyon aracılığıyla başlayan süreç daha uzun terapötik zaman aralığına sahiptir. Bu nedenle anti-inflamasyon favori tedavi hedeflerinden olmaktadır. [58]. İnflamasyon, nörotoksik veya nöroprotektif olabilen inflamatuvar hücreler ve moleküller arasındaki kompleks etkileşimler dizisidir [59, 60]. Kan-beyin bariyerinin bozulmasıyla dolaşımdaki lökositlerin (nötrofiller,

lenfositler ve monositler) iskemik alana infiltrasyonu, iskemi sonrası başlayan inflamasyon sürecinin merkezini oluşturmaktadır. Ayrıca merkezi sinir sisteminin ana inflamasyon hücreleri olan mikroglia ve yerleşik beyin makrofajlarının da aktivasyonu artarak iskemiden sonra 2-3. günlerde pik yapmaktadır [61]. İskemi ile aktive olan mikroglia ve astrositler interlökin 1 β (IL-1 β) ve tümör nekrosis faktörü α (TNF α) gibi pro-inflamasyon sitokinlerinin ve kemokinlerin salınımına sebep olmaktadır[62-66]. Bu kemokinler farklı inflamatuvar hücre tipleri ile hasarlı doku arasındaki iletişimi yöneterek özellikle penumbra çevresinde hücrel kemotaksiye ve lezyon işgaline neden olurken, pro-inflamasyon mediyatörleri de dolaşımdaki lökositlerin iskemik alana migrasyonunu destekleyerek kan-beyin bariyeri hasarını hızlandırmaktadır [61]. Aktivasyonu artmış inflamatuvar hücreler MMP'ler, NO ve ROS gibi birçok sitotoksik ajanın salınımını yaparak hücre hasarına, kan-beyin bariyeri bütünlüğünün ve ekstraselüler matriksin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu bozunma da nörotoksik serum maddelerinin beyne geçişine izin vererek beyin ödemiyle sonuçlanmaktadır [67].

Bununla birlikte mikroglia ve astrositler iskemik inmede iki yönlü fonksiyon göstermektedir. Mikroglialar nöroprotektif rolü olan TGF- β 1'i üretmekte, astrositler antiinflamatuvar yanıtı aktive eden moleküllerin üretimini sağlamaktadır [68]

4.4.Oksidatif Stres

Serbest radikaller hücrenin metabolik aktivitesi ve normal hücre fonksiyonu sonucu oluşmakta ve normal fizyolojik süreçte önemli biyolojik role sahip olmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücre sinyalizasyonu, immun savunma, hücre yaşlanması, apoptoz ve toksik bileşiklerin dekompozisyonunda rol oynamaktadır ve NO sinirsel sinyalizasyon ve immünolojik sürveyansın düzenlemesine katılmaktadır [69, 70] Serbest radikaller, bağımsız olarak varolabilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip herhangi bir atom ya da molekül olabilmektedirler. En yaygın olanları oksijenden türetilen ROS (superoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri) ve nitrik oksitten (NO) türetilmiş reaktif nitrojen türleridir (RNS) (NO ve peroksinitrit). Serbest radikaller fazlaca reaktiftir ve direkt olarak oksitleyerek protein, lipit ve DNA gibi makromoleküllere zarar vermektedir[71, 72].

Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin antioksidan savunma kapasitesinin toksik eşiğin altında tutma seviyesini aştığı durumu temsil etmektedir. Hücre farklı superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon detoksifikasyonu ve tioredoksin detoksifikasyonu gibi antioksidan savunmaları kullanmaktadır [73].

Oksidatif stres iskemik inmenin patolojik sürecinde önemli yere sahip olup, hasar alanı oluşumunda etkilidir. Enerji metabolizmasındaki bozukluktan kaynaklanan mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres iskemi sonrası geri döndürülemez hasarın ilerlemesindeki iki ana faktördür. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres sonucu hasar gören oksidasyon/antioksidasyon düzeni, nöronal mitokondrilerin nöron ölümü ile sonuçlanan çok miktarda ROS ve hidroksil radikallerini üretmesine neden olmaktadır. Serebral iskemi esnasında reaktif oksijen türleri (ROS) özellikle reperfüzyondan sonra hücre ölümüne, sonuç olarak da beyin ölümüne yol açabilmektedir. Doku hasarının patolojik sürecinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi veya temizlenme kapasitesinin azalması sonucunda oksidatif ve antioksidan sistemler arasındaki balansın bozulmasına sebep olmaktadır. Superoksit anyon serbest radikalleri, hidroksil serbest radikalleri ve nitrik oksitin üretiminin de gerçekleştiği reperfüzyon lipid peroksidasyonuna, inflamasyona ve apoptotik hücre ölümüne sebep olmaktadır [74] [75].

4.5.Mitokondriyal Disfonksiyon

İskemi kaynaklı eksitotoksisite, mitokondriyal proteinlere, membrana ve DNA'ya zarar verdiği için dolayı mitokondriyal bozuklukla sonuçlanmaktadır. Böylece mitokondrinin ATP sentezleme ve geniş yelpazedeki metabolik işlevleri yerine getirebilme yeneği bozulmaktadır. Aşırı Ca^{2+} yüklemesine bağlı olarak mitokondriyal membrandan intrinsik apoptotik sinyalizayona katılan pro-apoptotik faktörler salınmaktadır. İskemi aynı zamanda artmış ROS üretimi, azalmış ATP üretimi ve PTEN aracılı putatif kinaz 1 akümüasyonu ile sonuçlanan mitokondriyal membranın depolarizasyonunu da arttırmaktadır [76]. ATP üretimi azalmasının bir sonucu olarak, hasar görmüş mitokondri sağlıklı mitokondri ile füzyon yoluyla onarılır veya mitokondriyal fisyon, hasarlı mitokondrinin ayrılmasını ve ardından mitofaji yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır [77].

4.6.Ekzitotoksisite

Glutamat, uyarıcı bir nörotransmitter olarak işlev gören santral sinir sisteminin en çok bulunan serbest amino asitidir [78]. Fizyolojik koşullarda öğrenme ve hafızada önemli rol oynamaktadır ve astrositlerden glutamat salınımı hipokampal nöronların aktivitesini düzenlemektedir [79, 80]. Vücuttaki glutamatın büyük bir kısmı diyet ile alınmaktadır ancak kan-beyin bariyerini geçemediğinden santral sinir sistemindeki yerleşik hücreler tarafından üretilmesi gerekmektedir. Bu nedenle öncü molekülü olan alfa-ketoglurattan sentezlenmektedir[81, 82]. Ayrıca glutamat-glutamin döngüsünde glial hücrelerden üretilen glutaminden dönüştürülmektedir [83]. Normal sinaptik iletişimde nöronal hücrelerin aksonlarının presinaptik terminallerinden sinaptik aralığa glutamat salınımı yapılmaktadır. Ekstraselüler boşlukta biriken glutamat postsinaptik terminallerin yüzeyindeki glutamat reseptörlerini aktive etmektedir [82]. Optimal nöron uyarımını sürdürmek ve aynı zamanda eksitotoksik etkisini sınırlandırmak için ekstraselüler boşluktaki glutamat seviyesi üzerine sıkı bir fizyolojik düzenleme gerekmektedir. Glutamat homeostazının sürdürülmesi büyük ölçüde astrosidik taşıyıcıların aktivitesine dayanmaktadır ve fizyolojik koşullar altında glutamati sinaptik aralıktan temizlemektedir [84]. İskemi gibi patolojik durumlarda veya yaşlanma sürecinde, glial glutamat taşıyıcıların aktivitesi durmaktadır ve fazlaca glutamat çevredeki sinir dokusuna zarar vererek normal beyin fonksiyonlarını engellemektedir [85]. Ayrıca pro-inflamatuar sitokin faktörleri de glutamini tekrar glutamata dönüştüren glutaminazın astrositik ekspresyonunu arttırmaktadır. Astrositler, santral sinir sistemindeki ana glutamin fabrikasıdır. Bu sitokin etkisi ile ana hedeflerini kaybederek etkisiz hale gelmekte ve itihaplanma sırasında eksitotoksisiteyi uyaran olaylara aracılık hizmeti etmektedirler. Glutamerjik nörotransmisyonun disfonksiyonu, nöronal eksitotoksisiteye neden olarak hücreyi ölüme götürmektedir [86].

Glutamat eksitotoksisitesi nöronlardan glutamat salınımının artmasıyla başlayan hücre ölüm mekanizmasıdır. İskemik hasar sonucu düşük oksijen ve glikoz seviyeleri nedeniyle başlayan ve zamanla aktive olan zararlı kimyasal bileşiklerin varlığı nedeniyle de etkilenen bölgedeki nöronlar ve glialar ölmeye başlamaktadır. Beyinde oluşan enerjinin çoğu glikozun karbondioksit ve suya oksidasyonundan

kaynaklandığından oksijen yetersizliği mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu tamamen bozmaktadır [87]. Beyinde uzun süreli enerji depolarının bulunmadığından dolayı oksijen ve glikoz eksikliği sadece birkaç dakika içinde ATP tükenmesine sebep olmaktadır [88]. ATP eksikliği, iyon pompalarının fizyolojik fonksiyonlarını engellemektedir ve bu sebeple hücreler elektrokimyasal gradyanlarını koruyamadığından, potasyum (K^+), sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarının anormal akışı nedeniyle depolarize olmaktadır. Ekstraselüler konsantrasyonu artmış K^+ L-tipi voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının açılmasına sebep olmaktadır [89]. İyon pompaları artan Ca^{2+} konsantrasyonuna ayak uyduramadığından, yükselmiş Ca^{2+} seviyeleri nöronlarda ve glial hücrelerde iskemi kaynaklı eksitotoksisiteye önemli katkıda bulunan glutamat salınımını tetiklemektedir [90]. Bu uyarıcı aminoasit nörotransmitter olarak davranmakta ve glutamat reseptörlerine bağlanıp açılmasını sağlayarak hücre lümenine daha fazla Ca^{2+} girişine sebep olmaktadır. Bozulmuş glutamat alımına bağlı olarak Ca^{2+} kanallarının aşırı aktivasyonu hücre içi Ca^{2+} seviyesinin patolojik artışına neden olmaktadır [91]. Bu artış hücreleri aşırı uyararak ROS veya Ca^{2+} a bağımlı parçalayıcı enzimler grubuna ait olan ATPazlar, endonükleazlar, proteazlar ve fosfolipazların salgılanmasına yol açmaktadır [92]. İlk olarak hücre membranını fosfolipazlarla bozulmasıyla daha fazla zararlı kimyasallar hücre içine girmekte ve mitokondriden hücre ölümüne sebep olan kaspazları aktive eden apoptotik sinyallerin salınımına neden olmaktadır [93]. Zararlı sinyaller ölen hücrelerden yayılarak glia ve nöronları etkilemektedir. Peri-infarkt (enfarktüs) depolarizasyonu olarak adlandırılan bu olay nöronal ve glial glutamat salınımı ile tetiklenir ve hücrelerin depolarize olmasıyla iskemik çekirdek ve çevresinde ilerleyerek lezyon oluşturmaktadır [94, 95]. Artmış K^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonları sitotoksik ödeme de neden olmaktadır. Buna bağlı olarak perfüzyonun düşmesiyle penumbral bölge ve kor alanının genişlemesine neden olabilmektedir [95, 96].

4.7.Lityum

Lityum 100 yıldan fazladır manik depresyon tedavisinde kullanılmaktadır [97]. 2001'de Burgess ve arkadaşları lityumun duygu-durum bozuklukları üzerindeki etkisinin kanıtı için Cochrane Colloboratin Depresyon, Anksiyete ve Nevroz Kontrollü

Denemeleri Kaydı ve Cochran Konrollü Klinik Araştırmalarını incelemişlerdir. Lityumun tüm çalışmalarda bipolar bozukluk üzerine tutarlı ve anlamlı yararlı etkileri görülmektedir. Tek kutuplu bozuklukta, lityumun yararlı etkileri görüldü ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşılamadı. Ayrıca hiçbir çalışmada lityumun olumsuz etkisi bildirilmedi [98]. Tekrarlayan mani ve depresyon ile birlikte akut mani ve akut depresyonun tedavisinde etki gösteren tek tedavi olması nedeniyle de lityum, bipolar ve unipolar hastalık tedavisinde önerilmektedir ve 1970'lerin başında FDA tarafından uygulanması onaylanan ilk ilaçlardandır [99].

Lityum sodyum ve potasyum ile aynı ailede yer alan periyodik cetvelin alkali bir metalidir. Lityumun beyin ve kan damarları üzerinde mani ve depresyonu bastırıcı birçok etkisi vardır. Bu etkilerin altındaki mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Son 20 yıldır yapılan çalışmalarda farklı ve ilginç ipuçları elde edilmiştir. Birçok klinisyen lityum ile tedavi gören hastalarda sıklıkla beyaz kan hücrelerinin arttığını ve kan lenfosit sayısının azaldığını not etmişlerdir. Veterinerler kemoterapi ve radyoterapi sonrası beyaz kan hücreleri azalmış hayvanlara lityum uygulamaya başlamışlardır. Lityum, beyaz kan hücrelerini ve immun fonksiyonu hızla restore etmektedir. Bu etkiler ile lityumun etki mekanizması daha iyi anlaşılabilir. Bilim insanları lityumun beyaz kan hücresi üretimini arttırmasını anlayabilmek için kemik iliği kök hücrelerine lityum uygulamışlardır. Bu çalışmalar göstermiştir ki; lityum, majör mesajlaşma sistemi olan fosforlanmış inositleri etkilemektedir. İleriki çalışmalarda lityumun çeşitli fosfokinazları ve fosfatazları stimule ve inhibe ettiği gösterilmiştir [100].

Lityum 60 yılı aşkın süredir bipolar duygu durum bozukluğunun tedavisinde kullanılan birincil ilaçlardan biridir [101, 102]. Buna ek olarak lityum tedavisinin hem hayvan modellerinde hem de insanlarda Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif etkileri vardır [103, 104]. Lityum tedavisiyle yetişkin hayvan modeli, neonatal hayvanların iskemi/hipoksi modeli ve hem fokal hem de global serebral iskemide iskemik hasarı azaltmaktadır [104-110]. İskemi sonrası lityum uygulamasının da faydalı etkileri bildirilmiştir [108-111].

4.7.1. Lityumun farmakokinetiği

İnsanlarda lityumun farmakokinetiği ve terapötik konsantrasyon aralığı iyi tanımlanmıştır [112, 113]. Dar terapötik indeksi ve farmakokinetikteki bireyler arası önemli değişkenliği nedeniyle, lityum tedavisi kan konsantrasyonlarının yakından izlenmesini gerektirir [114]. İngiltere’de genel olarak konsantrasyonunun 0-4 mmol/l (mM) üzerinde olması gerektiği kabul edilmektedir [115].

Lityum, sodyum iyonu gibi suda çözünür ve plazma proteinlerine bağlanması ihmal edilebilir seviyededir. Fizikokimyasal özellikleri ve küçük moleküler boyutları nedeniyle de sodyum iyonu gibi hücre dışı ve hücre içi vücut sıvılarına iyi dağılmaktadır. Lityumun toplam vücut su hacminden biraz daha yüksek bir dağılım hacmi vardır, bu da onu bazı patofizyolojik değişiklikleri takiben sıklıkla gözlenen toplam vücut su hacmindeki büyük değişikliklere duyarlı hale getirmektedir. Örneğin yaşlanma ile birlikte artan vücut yağı, azalan yağsız kütle ve toplam vücut sıvısı gibi vücut kompozisyonunun değişmesi, lityumun dağılım hacmini ve tekrarlayan dozlarla kararlı duruma ulaşma süresini de azaltmaktadır [116].

Lityum, ortalama beyin-omurilik sıvısı lityum oranı 3,6:1 ile kan beyin bariyerini (KBB) geçmektedir. Ancak KBB yaşla birlikte bozulmaktadır ve beyne alınan lityum miktarı değişebilmektedir. Bununla birlikte lityuma verilen klinik yanıt yaşa bağlı fizyolojik değişikliklerden, tıbbi komorbiditeden ve daha yaşlı bir erişkinde lityumun farmakokinetiğini etkileyen ilaçlardan da etkilenebilmektedir [117]. Hem dağılım hacminde hem de renal klirenste yaşa bağlı azalmalar nedeniyle, daha genç bir yetişkinle karşılaştırıldığında aynı serum konsantrasyonuna ulaşmak için daha düşük bir lityum dozu gerekmektedir [118].

Son derece dar terapötik aralığı nedeniyle lityumun klinik kullanımı oldukça zordur. Terapötik etkiler için gereken konsantrasyonlar ile toksisiteye neden olabilecek konsantrasyonla yakındır. Lityum serum konsantrasyonlarındaki küçük bir artış ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Dar bir terapötik indekse rağmen, etkinlik ve tolere edilebilirlik ile belirlenen lityumun klinik profili henüz net farmakokinetik-farmakodinamik ilişkileri ile tanımlanmamıştır [116].

Lityum, ilk geçiş hepatik metabolizmasına tabi değildir [119]. Küçük bir miktar lityum (%2), oral uygulamadan sonraki 24 saat içinde safrada elimine edilebilmektedir

[120]. Bu nedenle lityumun farmakokinetiği hepatik biyotransformasyon veya hepatik kan akışındaki herhangi bir değişiklikten etkilenmemektedir [116]. Lityum, plazmada proteinlere bağlı olmayan ve serbestçe dolaşan diğer küçük moleküllere benzer filtrasyon hızı ile renal glomerül tarafından serbestçe süzülmemektedir. Süzüldükten sonra, lityumun yaklaşık %75-80'i proksimal tübüllerde aktif olarak geri emilirken, küçük bir kısmı da Henle döngüsünde ve distal tübüllerde yeniden emilmektedir [121-123]. Lityumun renal eliminasyon oranı serum seviyeleri ile doğrusal olarak ilişkilidir [119]. Plazmadaki lityumun terminal eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$), sağlıklı gönüllülerde ve normal böbrek fonksiyonuna sahip hastalarda 16 ila 30 saat arasında değişmektedir [124-130]. Bu eliminasyon fazı T_{max} 'tan 4-6 saat sonra gözlemlenebilmektedir. Uzun süreli lityum tedavisi sırasında veya böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda lityum eliminasyon yarı ömrü artmakta ve 50 saate ulaşabilmektedir [115].

Hayvan modelleri kullanılarak lityumun bazı farmakolojik özelliklerini aydınlatma girişimleri, lityum tuzlarının kemirgenlere de hem oral hem de parenteral yollarla uygulanmasını içermektedir [131]. Bununla birlikte, bu hayvanlarda lityumun farmakokinetiğine çok az ilgi gösterilmiştir. İnsan ve kemirgenler arasındaki farklılıklar, klinik uygulamada görülen plazma konsantrasyon profilini doğru bir şekilde ifade edememektedir. Geçmişte kullanılan bazı protokoller, değişen sürelerde lityum toksisitesine yol açarken bazıları ise terapötik konsantrasyona ulaşmada başarısız olmuşlardır. Ratlarda yapılan çalışmada lityum gastrointestinal sistem tarafından hızla emilerek plazma proteinlerine bağlanma ve metabolizma olmaksızın toplam vücut sıvılarına dağılmaktadır. Neredeyse sadece böbrekler tarafından atılmaktadır ve plazma yarı ömrü 6-7 saattir [132, 133].

4.7.2. Lityumun nörofarmakokinetiği

Lityum, nöroprotektif özelliklere sahip olduğu düşünülen bipolar bozukluk için yaygın olarak kullanılan birinci basamak tedavidir. Bununla birlikte hücre içi hedefler üzerinde etkili olduğu varsayılmasına rağmen terapötik etki mekanizmaları hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Yeterli serum seviyelerinde bile hastaların yaklaşık yarısı lityum tedavisine yanıt vermemektedir [134]. Bu da serum ve beyin lityum konsantrasyonları ile klinik etki arasındaki korelasyonun zayıf olabileceğini

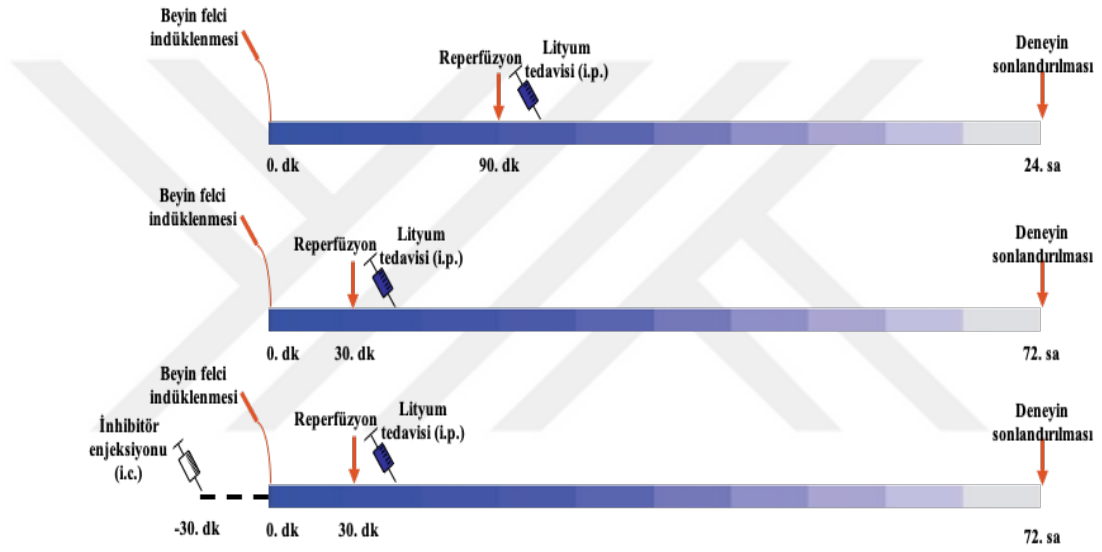
göstermektedir [135-139]. Yapılan dinamik çalışmalarda, serum, kırmızı kan hücreleri, kas veya BOS'taki artışa kıyasla 24 saatlik bir gecikmeden sonra beyin lityum konsantrasyonunda bir artış meydana geldiği görülmüştür. Kandan BOS'a lityum transfer hızının, KBB'deki geçişten daha hızlı olduğu düşünülmektedir [140-142]. İnsan beyininde lityumun yarı ömrü, serum eliminasyon yarı ömründen (16 saat) daha uzundur ve 28 saattir. Bu da lityumun beyinden kana daha yavaş salındığını göstermektedir [143]. İlk olarak insan otopsiyelerinden veya hayvanlardan alınan beyin dokusundaki endojen ölçümlerle belirlenen lityum dağılımı heterojendir. Bazı raporlar %20-30 gibi nispeten küçük varyasyonlara sahipken, bazıları farklı bölgeler arasında büyük farklılıklar bulmuştur [144]. İnsan örnekleri, orta beyin ve oksipital kortekste sürekli olarak en yüksek ve tipik olarak pons ve merkez semiovalede bulunan beyaz cevherde en düşük seviyeleri göstermiştir [145-147]. Benzer şekilde rat çalışmaları akut ve kronik uygulamayı takiben beyindeki bölgesel lityum dağılımında hem önemsiz hem önemli farklılıklar göstermiştir [148-151]. Bazı çalışmalarda bazal ganglionlar, neokorteks ve putamenlerde yüksek; pons, medulla, beyincik, omurilik ve beyaz cevherde düşük seviyeler gösterilmiştir [148, 150, 151]. Bununla birlikte talamus, hipotalamus, septal çekirdekler, dentat girus, hipokampus ve substantia grisea centralis'te orta düzeyler saptanmıştır [146].

Sodyum ve potasyum gibi birçok fizyolojik inorganik iyonla göre lityumun içsel plazma zarı geçirgenliği çok düşüktür. Hücre tipine bağlı olarak plazma zarına gömülü bazı spesifik proteinlerin ekspresyonu, spesifik ancak hız sınırlayıcı iyon hareketi ile inorganik iyonları zar boyunca taşıma yeteneğine sahiptir. Lityum membran geçirgenliği ile ilgili bu tür kanal veya taşıyıcı aracılı sistemlerin beyin hücrelerinde hala araştırılması gerekmektedir. Sodyum ile paylaşılan fiziko-kimyasal özellikler nedeniyle, lityumun sodyum/organik veya inorganik taşıyıcıları kullandığı düşünülmüştür ve birincil kortikal nöronal fare kültürlerinde gözlemlenmiştir [137, 152]. Vücutta ve özellikle beyin hücrelerinde lityum taşınmasında rol oynayan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için yapılan farmakogenomik çalışmalarda kan-BOS bariyerinde eksprese edilen bir sodyum/karbonat (NBC, SLC4 ailesi) taşıyıcısı olan SLC4A10'un lityum yanıtında rol oynadığı gösterilmiştir [153]

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Deney Grupları ve Dizaynı

Bu çalışma etik standartlara, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmıştır ve İstanbul Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından da onaylanmıştır. Çalışmada 9 haftalık erkek BALB/C suşu fareler kullanılmıştır. Beyin felci sonrası lityum tedavisinin moleküler ve elektrofizyolojik mekanizmalarını inceleyebilmek için 3 farklı deney seti dizayn edilmiştir.



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı

1. Deney Seti

Lityum tedavisinin beyin felci sonrası nörolojik duruma, hasar alanına, beyin ödeme ve kan-beyin bariyeri geçirgenliğine olan etkilerini incelemek için 90 dakika orta serebral arter tıkanması sonrası 24 saatlik reperfüzyon uygulanan deney seti dizayn edilmiştir.

Grup I: 90 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl serum fizyolojinin periton içine enjeksiyon

Grup II: 90 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl 2 mmol/kg LiCl'in periton içine enjeksiyonu

Grup II: 90 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl 5 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu
(n=8)

2. *Deney Seti*

Lityum tedavisinin beyin felci sonrası apoptotik hücre ölümü ve nöronal sağkalım üzerine etkilerini inceleyebilmek ve lityumun moleküler mekanizmalarında rol alan protein analizleri yapabilmek için 30 dakika orta serebral arter tıkanmasını sonrası 72 saatlik reperfüzyon uygulanan deney seti dizayn edilmiştir.

Grup I: 30 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl serum fizyolojinin periton içine enjeksiyonu

Grup II: 30 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl 2 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu

Grup II: 30 dakika beyin felci uygulamasını takiben 100 µl 5 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu
(n=8)

3. *Deney Seti*

Lityum aracılı nöroprotektif etkinin altında yatan moleküler mekanizmaların incelenmesi için, lityum tedavisinin spesifik Akt inhibitörü olan Wortmannin ve MAPK inhibitörü olan PD98059 ile kombin edildiği 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması sonrası 72 saatlik reperfüzyon uygulanan deney seti dizayn edilmiştir.

Grup I: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl %100 DMSO enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl serum fizyolojinin periton içine enjeksiyonu

Grup II: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl %100 DMSO enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl 2 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu

Grup III: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl 1 mmol PD98059 enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl serum fizyolojinin periton içine enjeksiyonu

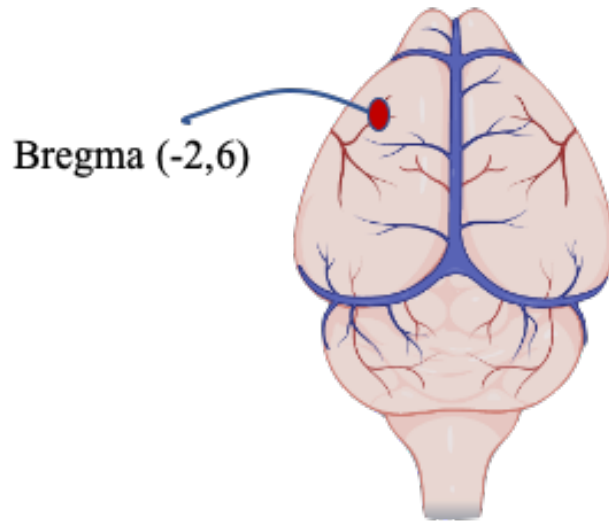
Grup IV: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl 1 mmol PD98059 enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl 2 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu

Grup V: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl 0,5 mmol Wortmannin enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl serum fizyolojinin periton içine enjeksiyonu

Grup VI: İskemiden 30 dakika önce striatuma 2 µl 0,5 mmol Wortmannin enjeksiyonu ve 30 dakikalık iskemi uygulamasını takiben 100 µl 2 mmol/kg LiCl'ün periton içine enjeksiyonu

(n=8)

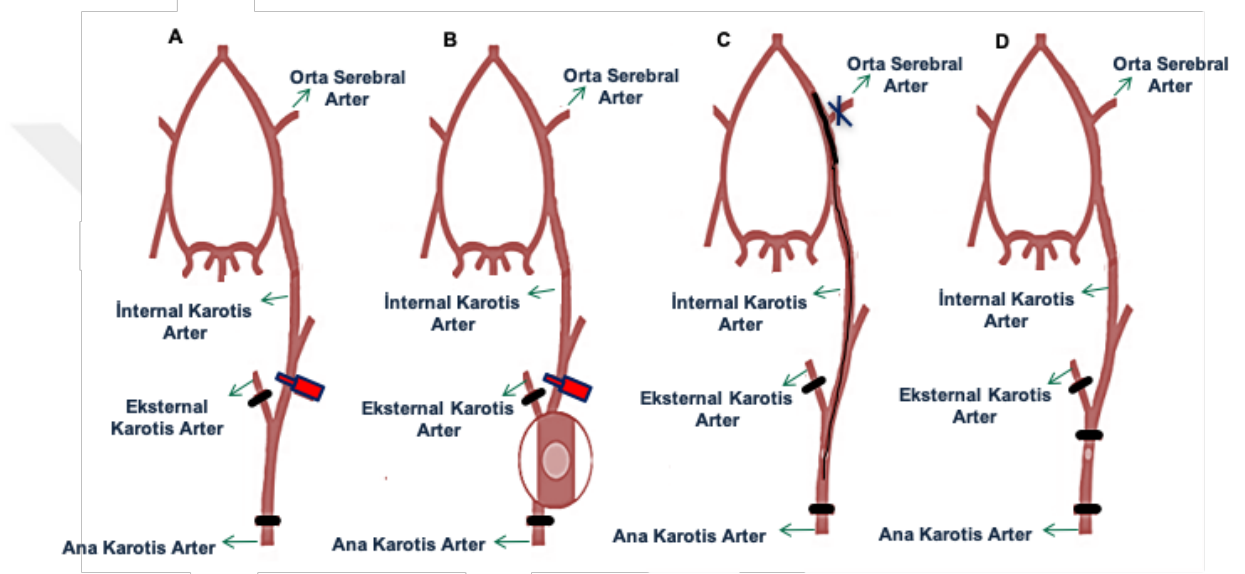
5.2.Beyin Kan Akımının Ölçülmesi



Şekil 5.2.1. Anlık kan akımı ölçümü bölgesi

Orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyon boyunca beyin kan akımındaki anlık değişimleri ölçebilmek için Laser Doppler flowmetre (Perimed) cihazı kullanıldı. Cihazın fiberoptik probu, Bregma seviyesinin -2 mm posterior ve 6 mm laterali olacak şekilde hasarlı hemisferde direkt kafatası kemiği üzerine dental yapıştırıcı ile sabitlendi.

5.3.Orta Serebral Arter Oklüzyonu Modeli



Şekil 5.3.1. Orta serebral arterin tıkanması modeli

9 haftalık BALB/C suşu erkek fareler orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyon boyunca %1'lik izofluran gaz anestezisi altında vücut sıcaklıkları 36,5-37,0 °C arasında tutuldu. OSAO modelini oluşturmak için monofilament tekniği kullanıldı. Bu teknikte, boyun bölgesine yapılan kesi sonrası, karotid arter izole edildi ve 6-0 ipek (S1165, Doğan) ipele ligasyon yapıldı. Karotid arterin bifurkasyon yapması ile ayrılan eksternal karotid artere de 6-0 ipek ipele ligasyon yapıldı. Geçici olarak damarı tıkmak için mikrovasküler klips internal karotid arter üzerine yerleştirildi. Kommon karotid artere damar makası ile kesi atıldı ve 7-0 kalınlığındaki monofilament (701934PK5Re, Docol) kesikten internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itildi. Orta serebral arterin doğru tıkandığı Laser Doppler flowmetre

(Perimed) cihazı yardımı ile beyin kan akımındaki düşüşten kontrol edildi. Oklüzyondan 90/30 dakika sonra ip geri çekildi, reperfüzyonun takip edilmesi amacıyla kan akımı 15 dakika daha takip edildi.

5.4.Lityumun hazırlanması ve enjeksiyonu

Kontrol ve lityum gruplarındaki fareler belirli bir sırayla operasyona alındı. İki farklı dozda lityum (L4408-100G, Sigma-Aldrich) hazırlandı; 2 mmol/kg ve 5 mmol/kg. Çözücü olarak serum fizyolojik kullanıldı. Reperfüzyon başlangıcından hemen sonra periton içine 100 µl enjeksiyon yapıldı. Kontrol gruplarına 100 µl serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

5.5.Wortmannin ve PD98059 hazırlanması ve enjeksiyonu

Spesifik Akt inhibitörü Wortmannin ve MAPK inhibitörü PD98059 ikinci deney setinde kullanıldı. Öncelikle etkin dozun bulunabilmesi için iki farklı doz belirlendi. Bu amaçla 0,1 mM ve 0,5 mM wortmannin ve 0,2 mM ve 1 mM PD98059 DMSO'da çözülerek günlük olarak hazırlandı. Enjeksiyon iskemiden 30 dakika önce 2 µl olarak Bregma seviyesinden 2,5 mm laterale ve 3 mm içeriye yapıldı.

5.6.Nörolojik defisit ölçümü

90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saat sonra fareler sakrifiye edilmeden hemen önce 4 puanlı nörolojik skorlamaya tabii tutuldu.

0: Normal fonksiyon,

1: Kuyruktan kaldırılınca kontralateral taraftaki eli çekme,

2: Kontralateral tarafa daireler çizerek hareket etme ve normal görünüş,

3: Kontralateral tarafa daireler çizerek hareket etmeye çalışma ve yürümekte zorlanma,

4: Herhangi bir motor aktivite olmadığı zaman [3].

5.7.Beyinden örnek alınması



Resim 5.7.1. Cryostat cihazı

İskemiden 24/72 saat sonra fareler derin izofluran gaz anestezisi altında dekapitasyon ile sakrifiye edilerek beyinler alındı ve kuru buz üzerinde hızla donduruldu. Dondurulan beyinlerden immünohistokimya çalışmaları için kryostat cihazında (CM, Leica) Bregma seviyesinden 18 µm'lik koronal kesitler alındı. Bunu yanında protein çalışmaları için ise iskemik ve iskemik olmayan striatum seviyesinden doku örnekleri alındı.

5.8.Cresyl Violet Boyaması

Hasar alanının ve beyin ödeminin belirlenmesi için 90 dakika iskemi modeli uygulanmış hayvanlardan alınan kesitlere Cresyl violet boyaması yapıldı. -80 °C'den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek daha sonra %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonunda 15 dakika inkübe edildi. 0.1 M fosfatlanmış tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandıktan sonra 2 dakika masa üzerinde 13 dakika çalkalayıcı üzerinde Cresyl violet (C5042-106, Sigma Aldrich) boyası ile muamele edildi. Kesitler boyamadan hemen sonra her birinde beşer saniye inkübe edilecek şekilde sırasıyla %70, %90, %95 ve %100'lük etanol (24102, Sigma Aldrich) serisinden geçirildi. Alkol serisinden boyanın fikse olması için ksilen (108684, Merck) solüsyonuna alınan kesitler etellan (M1289, Sigma Aldrich) ve lamelle kapatıldı. Işık

mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss, Almanya) kullanılarak görüntüleme yapıldı. Alınan görüntülerde kontralateral ve ipsilateral alanları ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı ile ölçülerek, kontralateralden ipsilateralin çıkarılması ile hasar alanı hesaplandı.

5.9.Kan-Beyin Bariyeri geçirgenliğinin immunoglobulin G Boyamasıyla İncelenmesi

İmmunoglobulin (IgG) boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories, ABD) kiti kullanıldı. Bu amaçla -80 °C'den çıkarılan 90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saatlik reperfüzyon uygulanmış farelerin koronal kesitleri 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Kuruyan kesitler 15 dakika %4 PFA solüsyonunda bekletildi. Fiksasyon sonrasında kesitler PBS çözeltisinde yıkamaya alındı. %0.3 H₂O₂ içeren metanol içerisinde 30 dakika inkübe edilen kesitler PBS çözeltisinde tekrar yıkamaya alındı. Bloklama işlemi için normal at serumu (NHS, vectostain) uygulanarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Örnekler PBS ile yıkandı ve üzerine biyotinlenmiş ikincil antikor eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkanan örnekler streptavidin/ peroksidaz kompleksi ile 5 dakika inkübe edildi. Kit içerisinde bulunan solüsyonlarla kullanım kılavuzuna uygun şekilde DAB substrat solüsyonu hazırlandı. Örnekler üzerine DAB substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatıldı ve yaklaşık 90 saniye sonunda reaksiyon soğuk PBS çözeltisi ile durduruldu. Örnekler uygun kapama sıvısı ile kapatıldı.

5.10. İn-sitü Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile DNA Kırıklarının Belirlenmesi

DNA kırıklarının in sitü olarak tanınması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi için TUNEL kiti (11684795910, Roche) kullanılarak apoptotik hücre tayini yapıldı. Bu amaçla -80 °C'den çıkarılan 30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 satlik reperfüzyon uygulanmış farelerin koronal kesitleri 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Kuruyan kesitler %4'lük PFA solüsyonu içerisinde önce oda

sıcaklığında 10 dakika sonra +4 °C’de 10 dakika bekletildi. Fiksasyon sonrasında kesitler PBS çözeltisinde yıkamaya alındı. Membran geçirgenliği uygun solüsyonlarla sağlandıktan sonra kesitler bloklama için normal keçi serumunda (NGS, G9023, Sigma Aldrich, ABD) oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bloklama aşamasından sonra kesitler enzim ve substrat içeren TUNEL karışımında 37 °C’de 70 dakika inkübe edildi. Hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için 4’6-diamino-2-phenylindole (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) boyaması yapıldı ve sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, ABD) ile kapatıldı. Boyama ile ilgili analizlerin yapılması için iskemik striatumdan 9 alan belirlenerek fotoğraflandı ve bu alanda TUNEL (+) hücreler sayıldı. Her grup için ortalama değerler hesaplandı.

5.11. NeUN Boyaması ile Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi

-80 °C’den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından %4’lük PFA solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyon bitiminde kesitler PBS çözeltisinde yıkamaya alındı. Kesitler uygun bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bloklama aşamasından sonra kesitler NeUN primer antikoru ile 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kesitler PBS ile yıkandı. Hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için DAPI boyaması yapıldı ve uygun kapama sıvısı ile kapatıldı. Canlı nöron analizi için striatumda belirlenen 6 bölgede, her iki ipsilateral ve kontralateral alanda pozitif hücreler sayıldı ve her grup için ortalama değer hesaplandı [154, 155].

5.12. GFAP boyaması ile glial hücrelerin değerlendirilmesi

-80 °C’den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından %4’lük PFA solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyon bitiminde kesitler PBS çözeltisinde yıkamaya alındı. Kesitler uygun bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bloklama aşamasından sonra kesitler GFAP primer antikoru ile 16-18 saat +4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kesitler PBS ile yıkandı. Hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için DAPI boyaması yapıldı ve uygun kapama sıvısı ile kapatıldı. Glial hücre analizi ipsilateral alanda striatum ve korpus kallosumun

belirlenen bölgelerinde pozitif hücreler sayılarak yapıldı ve her grup için ortalama değer hesaplandı.

5.13. Protein Analizlerinin Yapılması

5.13.1. Protein izolasyonu

-80 °C'den çıkarılan dokulara lizis solüsyonu (1M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 EDTA, protease inhibitor coctail; 20-201, Milipore, ABD) ilave edildi. Dokular homojenizatör (Silent Crusher S.; Heidolp) yardımıyla homojenize edildi. Örnekler 20 dakika buz üzerinde inkübasyonun ardından 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar pelletlerden ayrılarak toplandı ve alikotlandı.



Resim 5.13.1. Homojenizatör

5.13.2. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi

Protein konsantrasyonları Qubit® Protein çalışma kiti (Q33211; Invitrogen) kullanılarak Qubit Fluorometer 3.0 (Q32866; Invitrogen) cihazı ile ölçüldü. Protein konsantrasyonu ölçülecek örnekler ve Qubit cihazının kalibrasyonunun yapılması için kullanılan 3 standart solüsyon için tampon solüsyonu hazırlandı. Qubit protein analiz kitinden bulunan Qubit protein tamponu ve aynı kit içerisinde bulunan Qubit bileşimi karıştırıldı. Kalibrasyon standartları olan standart 1, standart 2, standart 3 tüplerine 190

µl tampon solüsyonu ve 10 µl standart çözeltilerinden eklendi. Ölçümü yapılacak olan örnek tüplerine 198 µl tampon çözeltisi ve 2 µl protein örneği konuldu. Örnekler vorteks edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kalibrasyon tüpleri sırasıyla okutularak Qubit 3.0 cihazı kalibre edildi ve örnekler okutularak protein konsantrasyonları hesaplandı.



Resim5.13.2.1. Qubit cihazı

5.13.3. Western Blot

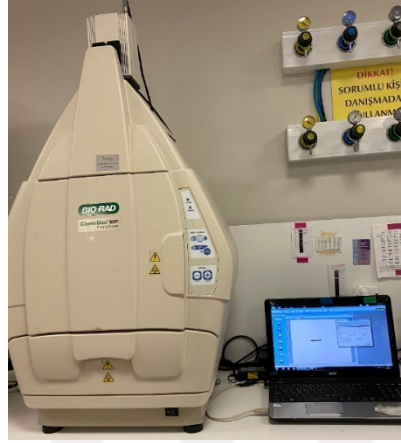
Örnekler, konsantrasyon ölçümlerine göre eşitlenip 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplandı, 2X Laemmli buffer (161-0737; Biorad) ve otoklavlanmış ddH₂O ile karıştırılarak 95 °C’de 5 dakika bekletildi, daha sonra +4’deki kırık buz üzerine alındı. Yükleme yapılmadan önce örnekler mini santrifüj cihazında (MINO-10K, INOVIA Technology) çevrildi.



Resim 5.13.3.1. Transfer cihazı

Mini-Protean TGX Precast protein jel (4569033) 4'lü dikey jel elektroforez tankına (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) yerleştirildi. Gerekli tampon çözelti /25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) eklendi. Örnekler her bir kuyucuğa 20 µg/ 10 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforezin süresini belirlemek için protein işaretçisi Precision Plus Protein-All blue standards (163-0393, Biorad Life Sciences, Kaliforniya; ABD) yüklendi. Güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) kullanılarak 50 V'da 5 dakika, daha sonra 100 V'da bir saat ve en son 150 V'da bir saat daha yürütüldü. Ardından Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti (170-4272; Bio-Rad, ABD) kullanılarak jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edildi. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) oda sıcaklığında 1 saat blokladı. Bloklamadan sonra TBS-T ile yıkanan membranlar +4 °C'de gece boyunca bloklama solüsyonunda seyreltilen primer antikolar (fosfo-Akt (2965; Cell Signalling Technologies), fosfo-ERK42/44 (9101; Cell Signalling Technologies) ile inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün TBS-T ile yıkandı ve Horseradish Peroksidaz enzimi ekli olan sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bantların görüntülenmesi için deteksiyon solüsyonu (Clarity™ Western ECL Substrate, 1705060, Bio-Rad) ile

5 dakika muamele edildi ve membranlar, ChemiDoc MP (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntüledi.



Resim 5.13.3.2. Görüntüleme sistemi

5.13.4. Stripleme

Membranlar strip solüsyonu (21059, Thermo Scientific) ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından TBS-T ile yıkanarak ve bloklama aşamasından itibaren izlenen protokol β -actin (4979; Cell Signalling Technologies) kullanılarak tekrar edildi.

5.13.5. Değerlendirme

Tüm sonuçlar ImageJ programında analiz edildi. Her bir proteinin optik yoğunluk değerinden arka plan (background) çıkarıldıktan sonra, değerler endojen kontrol kullanılan β -actin proteinine göre optimize edildi ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

5.14. İstatistik

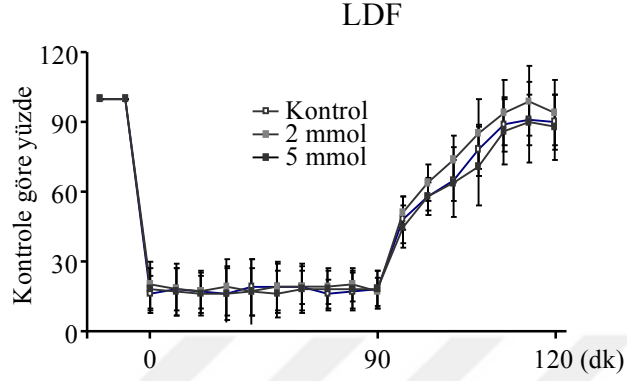
Deney grupları arasındaki istatistiksel analizler SPSS programı (Ibm) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü (one-way) varyans analizi

(ANOVA) kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edildi (least significant difference).



6. BULGULAR

6.1. 90 dakikalık OSA Tıkanması Kan Akımı Kaydı

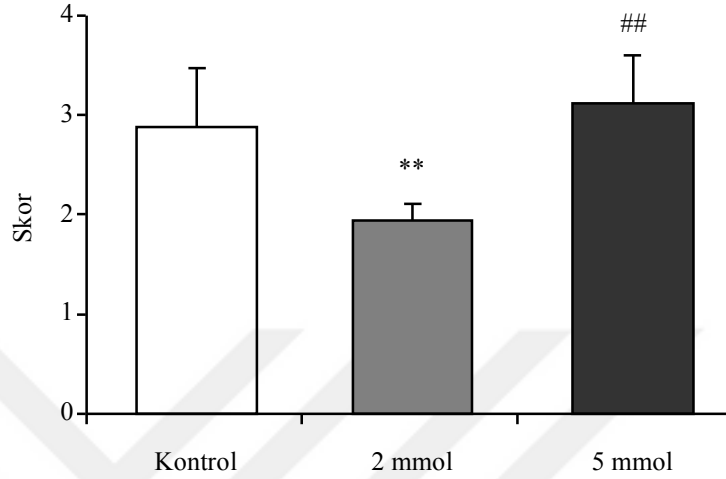


Şekil 6.1.1. 90 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

90 dakikalık orta serebral arter tıkanması modelinin tekrar edilebilirliğini ve hayvan deneylerini başarısının kontrolü için orta serebral arterin beslediği striatum bölgesinden (Bregma – 2mm posterior; 6 mm lateral) cerebral iskemi boyunca LDF kaydı alındı. Orta serebral arter monofilament tekniği kullanılarak tıkanıldıktan sonra beyin kan akımı operasyon öncesine oranla %80 düştü. 90 dakika boyunca beyin kan akımı operasyon öncesi sağlıklı beynin kan akımına göre %20'lik oranda kaldı. Monofilamentin geri çekilmesiyle birlikte kan akımı tekrar yükseldi. Reperfüzyon esnasından 30 dakika LDF kaydı alındı.

6.2. Nörolojik Hasar Skoru

Bederson Testi



Şekil 6.2.1. Nörolojik hasar skorlaması. 90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyonun sonunda uygulanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ /* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saat sonra fareler sakrifiye edilmeden hemen önce nörolojik durumlarına göre 4 puanlı nörolojik skorlamaya tabii tutuldu.

0: Normal fonksiyon,

1: Kuyruktan kaldırılınca kontralateral taraftaki eli çekme,

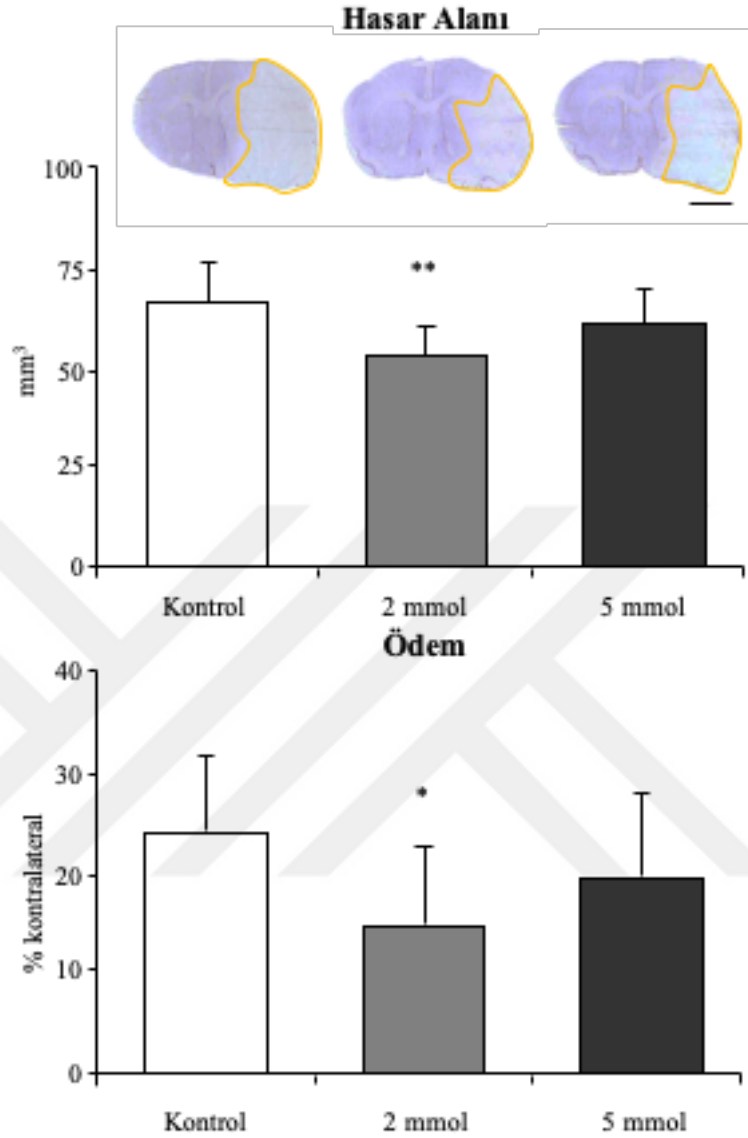
2: Kontralateral tarafa daireler çizerek hareket etme ve normal görünüş,

3: Kontralateral tarafa daireler çizerek hareket etmeye çalışma ve yürümekte zorlanma,

4: Herhangi bir motor aktivite olmadığı zaman [3].

Nörolojik hasar skorlamasında farelerin ortalama skorları; serum fizyolojik kontrol grubunda 2.88 ± 0.6 , 2 mmol/kg LiCl grubunda 1.94 ± 0.17 ve 5 mmol/kg LiCl grubunda 3.13 ± 0.48 olarak hesaplandı. Buna göre 2 mmol/kg LiCl enjeksiyonu yapılan grup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı seviyede daha iyi nörolojik davranış gösterdi. 5 mmol/kg LiCl enjeksiyonu yapılan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

6.3. Hasar Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi



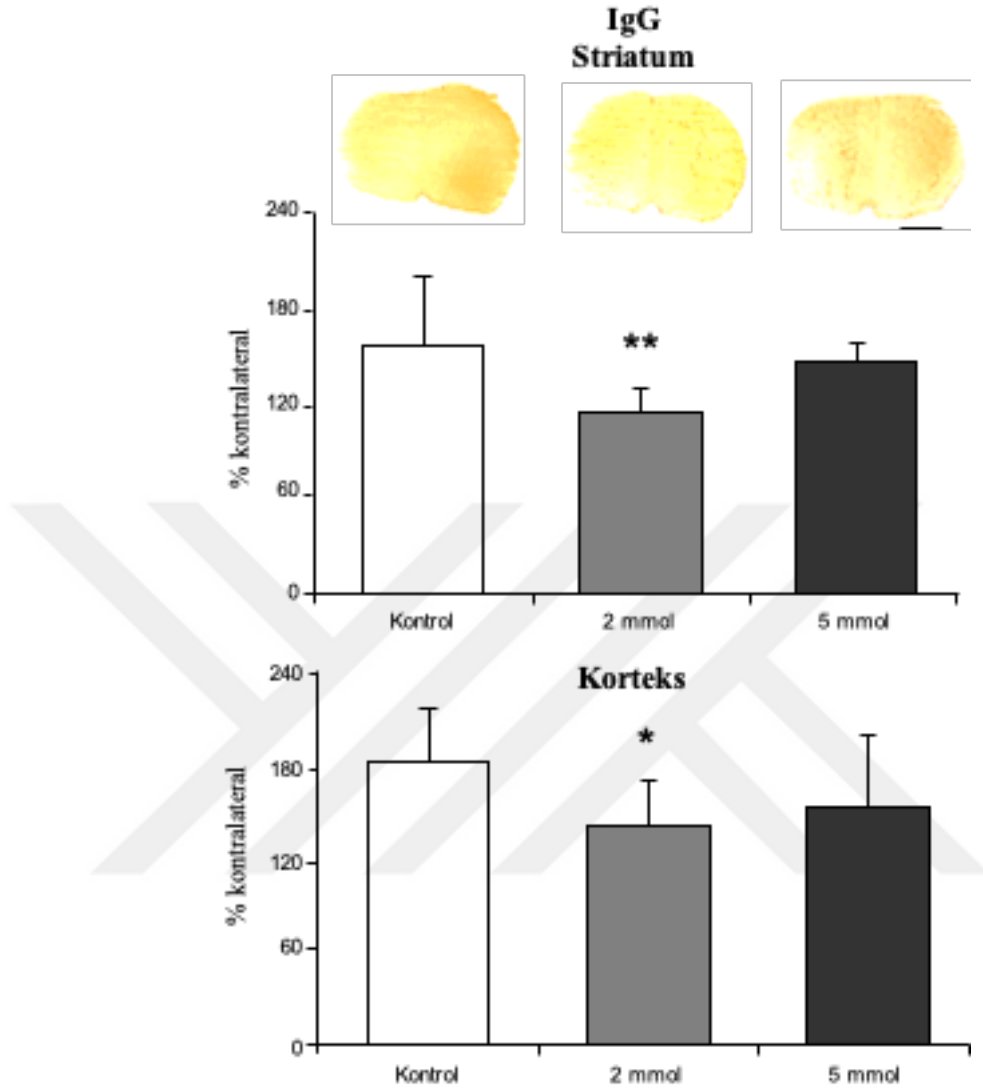
Şekil 6.3.1. (A) Cresyl violet boyaması ile hasar hacmi ölçümü. (B) Sitotoksik ödem hesaplanması. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ /
* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerde hasar hacmi ve beyin ödemi hesaplaması için Cresyl violet boyaması yapıldı. Boyalı kesitlerden Image J ile hasarlı alanlar ve toplam beyin alanları ölçülerek infarkt hacmi ve ödem hesaplandı. Hasar hacimleri sırasıyla kontrol grubunda $65.78 \pm 10.19 \text{ mm}^3$, 2mmol/kg LiCl grubunda $52.41 \pm 7.36 \text{ mm}^3$ ve 5 mmol/kg LiCl grubunda 3.13 ± 0.48

mm³ olarak hesaplandı. 2 mmol/kg LiCl grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p<0.01$) anlamlı derecede hasar hacmini azalttığı görüldü. Hasar hacminde 5 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerde beyin ödemi iskemik hemisferin iskemik olmayan hemisfere göre farkı hesaplanarak belirlendi. Ödem seviyeleri sırasıyla kontrol grubunda 23.64 ± 7.66 , 2 mmol/kg LiCl grubunda 15.54 ± 7.64 ve 5 mmol/kg LiCl grubunda 19.45 ± 8.09 olarak hesaplandı. Oluşan sitotoksik ödemlere göre 2 mmol/kg LiCl grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p<0.05$) daha az ödeme sahip olduğu gösterildi. 5 mmol/kg LiCl uygulanan grupta ödem analizinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

6.4. Kan-Beyin Bariyer Geçirgenliği Analizi

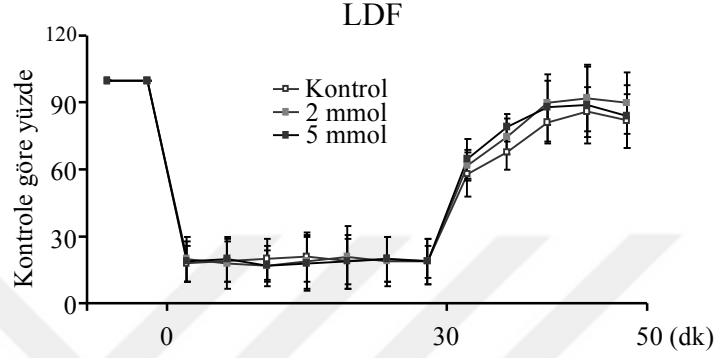


Şekil 6.4.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin iskemik striatum (A) ve korteks (B) seviyesinde IgG boyaması ile değerlendirilmesi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

90 dakikalık iskemi modelini takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerde KBB geçirgenliğini hesaplamak için IgG boyaması yapıldı. KBB geçirgenliğinin iskemik alanda bozulması iskemik olmayan alana oranlanmasıyla hesaplandı. 2 mmol/kg LiCl grubu kontrol grubuna kıyaslandığında KBB geçirgenliği bozulmasının

istatistiksel olarak striatumda ($p<0.01$) ve kortekste ($p<0.05$) azaldığı gözlemlendi. 5 mmol/kg LiCl uygulanan grupta striatum ve kortekste KBB geçirgenliğindeki bozulmada kontrol grubuna göre anlamlı derece bir değişim görülmedi.

6.5. 30 dakikalık OSA Tıkanması Kan Akımı Kaydı

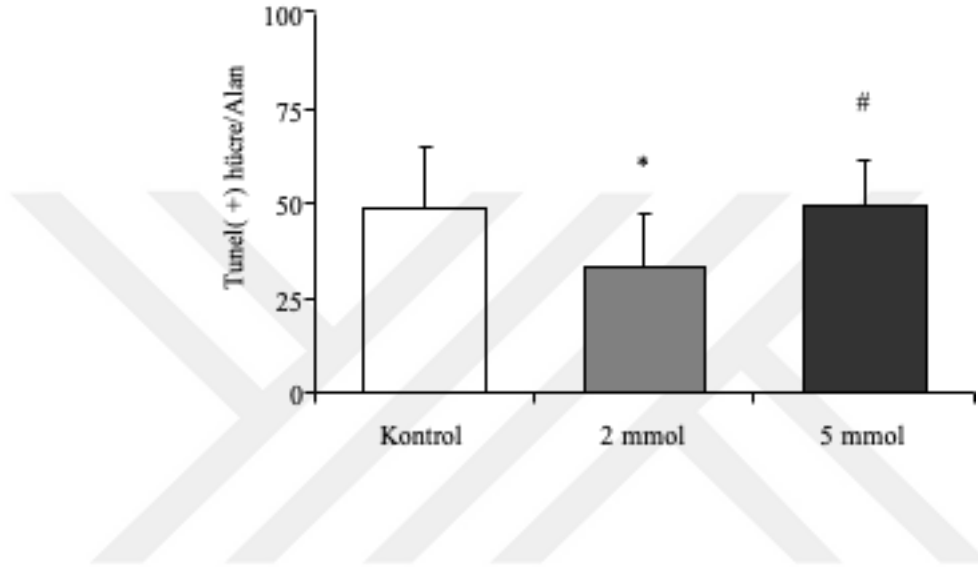
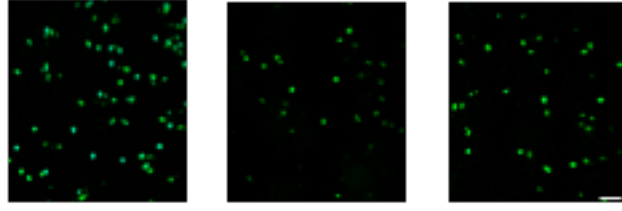


Şekil 6.5.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

30 dakikalık iskemi modelinin tekrar edilebilirliğini ve hayvan deneylerini başarısının kontrolü için orta serebral arterin beslediği striatum bölgesinden (Bregma – 2mm posterior; 6 mm lateral) cerebral iskemi boyunca LDF kaydı alındı. Orta serebral arter monofilament tekniği kullanılarak tılandıktan sonra beyin kan akımı operasyon öncesine oranla %80 düştü. 30 dakika boyunca beyin kan akımı operasyon öncesi sağlıklı beynin kan akımına göre %20'lik oranda kaldı. Monofilamentin geri çekilmesiyle birlikte kan akımı tekrar yükseldi. Reperfüzyon esnasından 15 dakika LDF kaydı alındı.

6.6. 30 dakikalık OSA Tıkanması DNA Fragmantasyonu Analizi

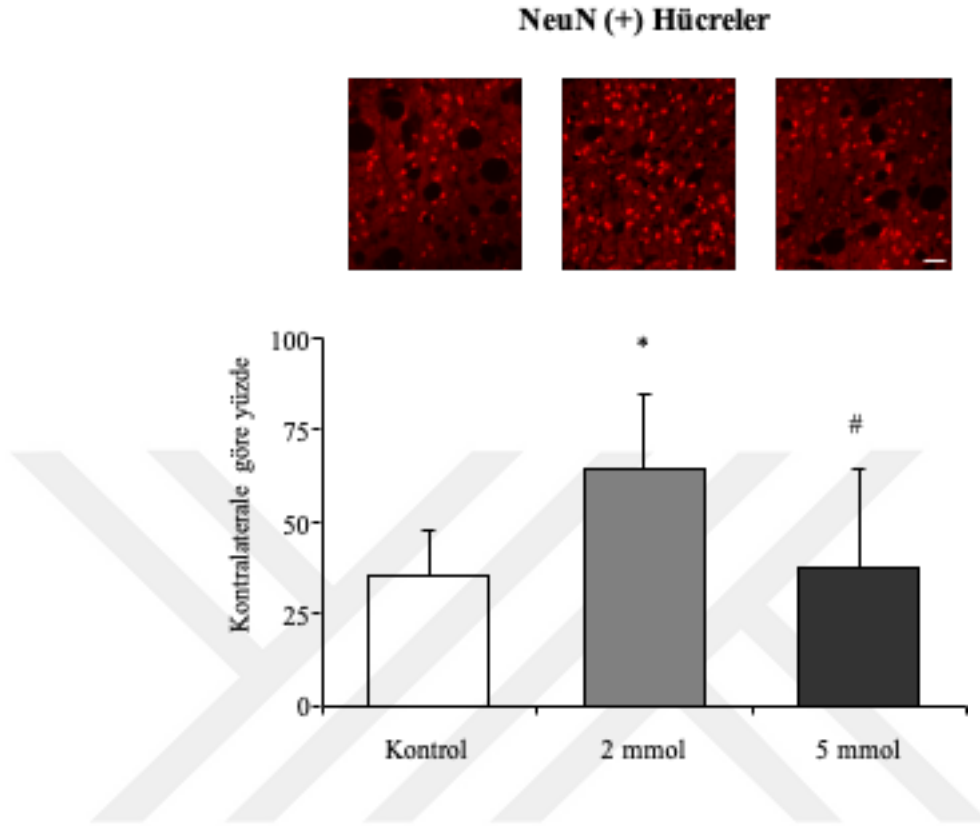
Tunel (+) Hücreler



Şekil 6.6.1. TUNEL boyaması ile apoptoz değerlendirilmesi

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saat reperfüzyon uygulanan fare kesitlerine iskemik bölgedeki apoptotik hücrelerin tayini için TUNEL boyaması yapıldı. İskemik striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan TUNEL (+) hücre sayımı yapıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama apoptotik hücre sayıları; kontrol grubunda 48.8 ± 16.0 , 2 mmol/kg LiCl grubunda 33.0 ± 14.5 ve 5 mmol/kg LiCl grubunda 49.7 ± 12.0 olarak belirlenmiştir. Buna göre 2 mmol/kg LiCl grubundaki apoptotik hücre sayısının kontrol grubunu göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde azaldığı gösterildi. Bununla birlikte 5 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi. Ek olarak 5 mmol/kg LiCl grubu, 2 mmol/kg LiCl grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi.

6.7. 30 dakikalık OSA Tıkanması Nöronal Sağkalım Analizi



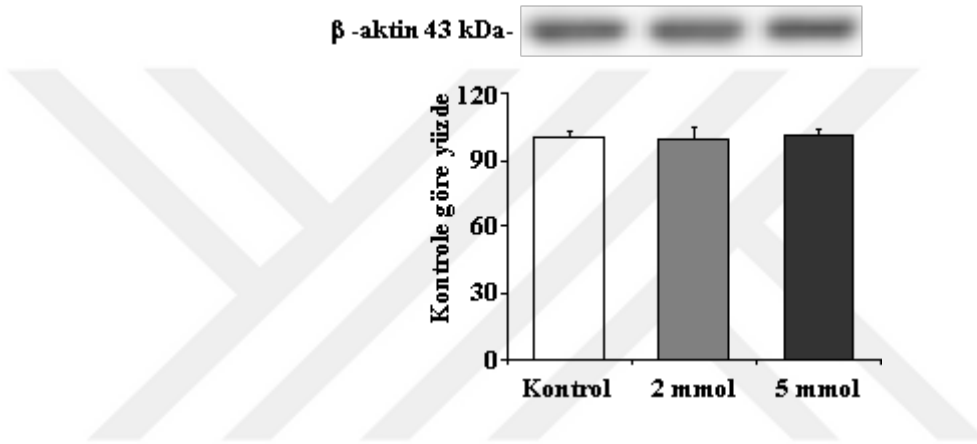
Şekil 6.7.1. NeUN boyaması ile nöronal sağkalımın değerlendirilmesi

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saat reperfüzyon uygulanan fare kesitlerine iskemik bölgedeki nöronal sağkalım analizi için NeUN boyaması yapıldı. İskemik ve iskemik olmayan striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan NeUN (+) hücreler sayıldı. Nöronal sağkalım iskemik striatumun iskemik olmayan striatuma oranlanmasıyla ölçüldü. Buna göre; kontrol grubu 35.2 ± 12.40 , 2 mmol/kg LiCl grubu 64.3 ± 20.9 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 37.4 ± 27.0 olarak hesaplandı. Buna göre 2 mmol/kg LiCl grubundaki canlı nöron sayısının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterildi. 5 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

6.8. 30 dakikalık OSA Tıkanması Western Blot Sonuçları

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon yapılan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan doku örneklerine Western Blot ile protein analizi yapıldı. Yapılan protein ölçümleri β -Aktin proteinine göre normalize edilerek hesaplandı.

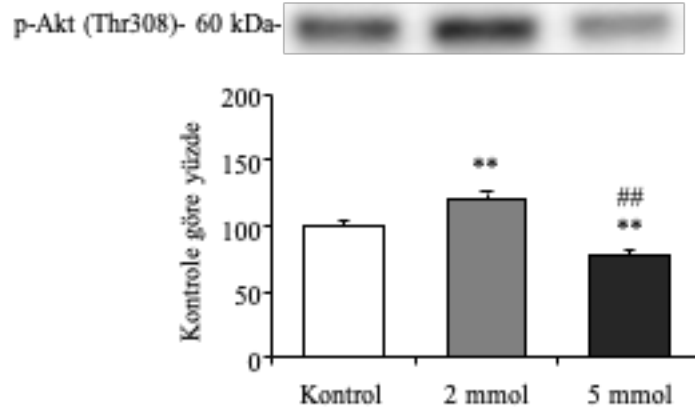
6.8.1. β -Aktin Protein Analiz



Şekil 6.8.1.1. β -Aktin protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda β -Aktin protein seviyesi analiz edilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Her grup için 20 μ g/10 μ l protein olacak şekilde yükleme yapıldı. Eşit miktarda protein yüklemesi yapıldığı β -Aktin protein seviyelerinin analizi ile gösterildi.

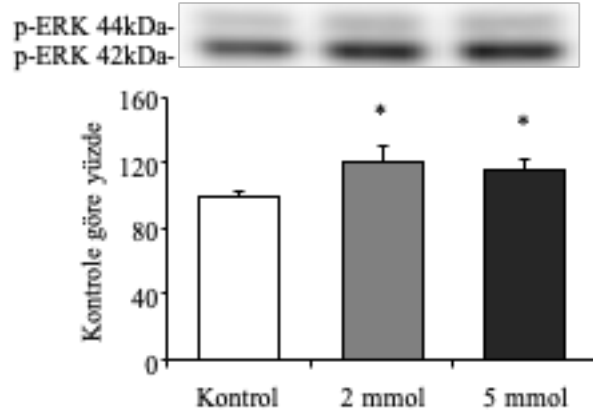
6.8.2. P-Akt Protein Analizi



Şekil 6.8.2.1. P-Akt protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda p-Akt protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ /* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde fosforlanmış Akt seviyesi hesaplandı. Hesaplamalar serum fizyolojik kontrol grubuna oranlanarak yapıldı. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 5.6 , 2 mmol/kg LiCl grubu 121.8 ± 3.7 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 78.51 ± 2.8 olarak hesaplandı. Akt fosforlanmasının 2 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede arttığı görüldü. Buna karşın 5 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı seviyede azaldığı görüldü.

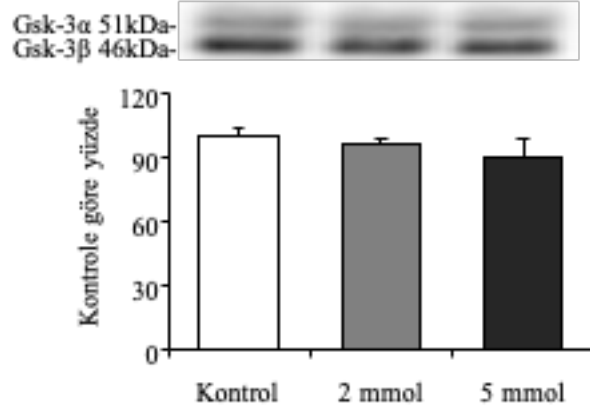
6.8.3. P-ERK-1/-2 Protein Analizi



Şekil 6.8.3.1. P-ERK1/2 seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda p-ERK1/2 protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde fosforlanmış ERK-1/-2 seviyesi hesaplandı. Fosforlanmış ERK-1/-2'lerin ölçümü kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 3.28 , 2mmol/kg LiCl grubu 120.0 ± 11.1 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 116 ± 7.0 olarak hesaplandı. ERK-1/-2 fosforlanmasının 2 mmol/kg LiCl ve 5 mmol/kg gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede arttığı görüldü.

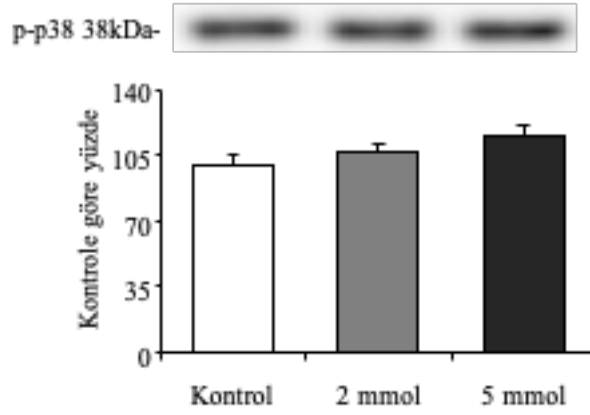
6.8.4. P-GSK-3 α/β Protein Analizi



Şekil 6.8.4.1. P-GSK-3 α/β protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda p-GSK-3 α/β protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde fosforlanmış GSK-3 α/β seviyesi hesaplandı. Hesaplamalar kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 3.6 , 2 mmol/kg LiCl grubunda 96.0 ± 2.2 ve 5 mmol/kg LiCl 90.0 ± 3.9 olarak hesaplandı. GSK-3 α/β fosforlanmasının 2 mmol/kg LiCl ve 5 mmol/kg gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

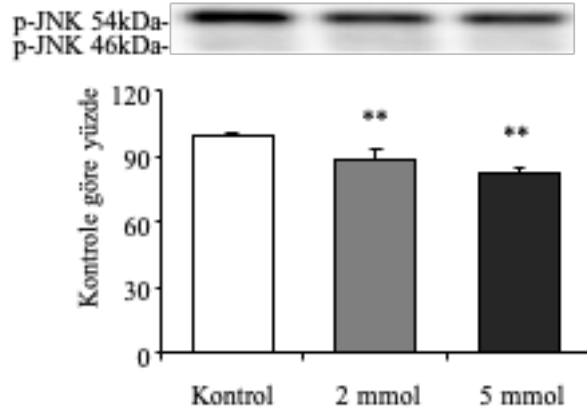
6.8.5. P-p38 Protein Analizi



Şekil 6.8.5.1. P-p38 protein seviyesi 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda p-p38 protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde fosforlanmış p38 seviyesi hesaplandı. Fosforlanmış p-38 seviyesi ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 4.6 , 2 mmol/kg LiCl 106.0 ± 5.5 ve 5 mmol/kg LiCl 115.0 ± 6.2 olarak hesaplandı. p38 fosforlanmasının 2 mmol/kg LiCl ve 5 mmol/kg gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttığı ancak bu artmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

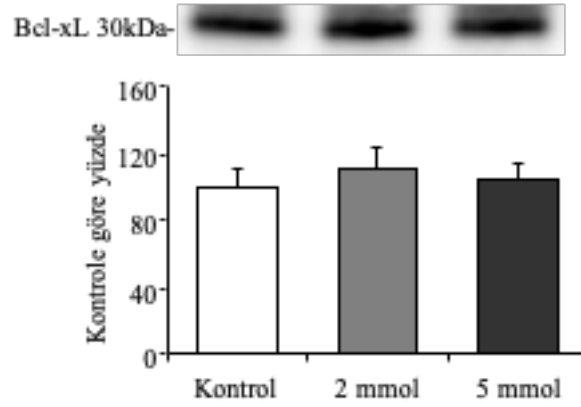
6.8.6. P-JNK Protein Analizi



Şekil 6.8.6.1. P-JNK protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda p-JNK protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

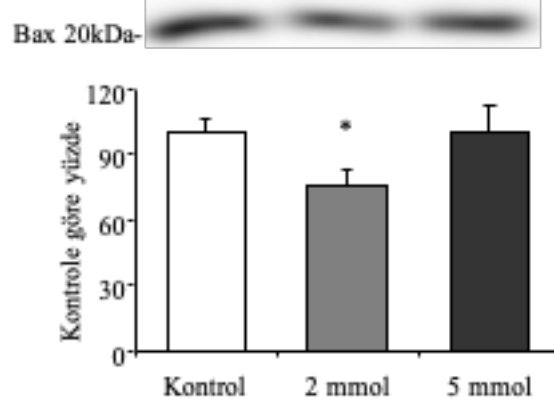
30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde fosforlanmış p-JNK seviyesi hesaplandı. Fosforlanmış JNK seviyelerinin ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 1.13 , 2 mmol/kg LiCl 89.0 ± 4.4 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 82.0 ± 2.6 olarak hesaplandı. JNK fosforlanmasının her iki ± 2 mmol/kg ve 5 mmol/kg LiCl gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede azaldığı görülmüştür.

6.8.7. Bcl-xL, Bax ve Bcl-xL/Bax Protein Analizi



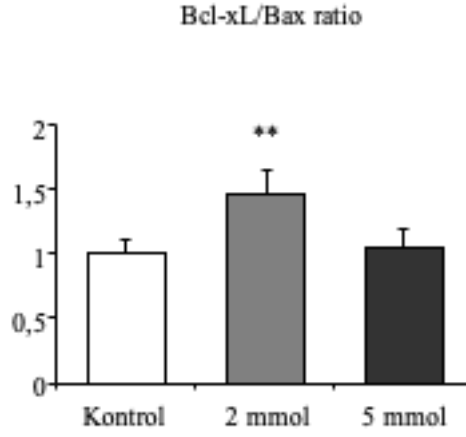
Şekil 6.8.7.1. Bcl-xL protein seviyesi. 30 dakikalık OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda Bcl-xL protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde Bcl-xL seviyesi hesaplandı. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl-xL protein seviyesinin ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 11.3 , 2 mmol/kg LiCl grubu 111.0 ± 12.7 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 104.0 ± 10.0 olarak hesaplandı. Bcl-xL seviyesinin 2 mmol/kg ve 5 mmol/kg LiCl gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.



Şekil 6.8.7.2. Bax protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda Bax protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

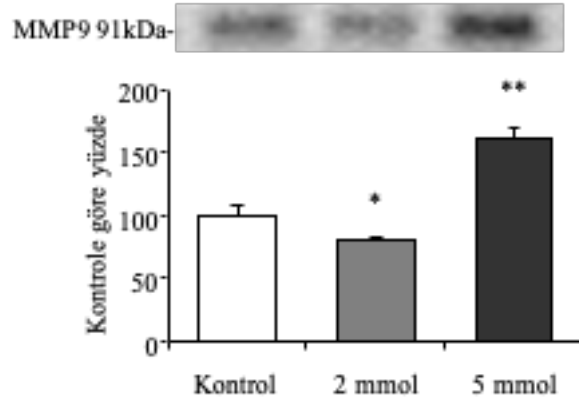
Pro-apoptotik bir protein olan Bax protein seviyesinin ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 6.2 , 2 mmol/kg LiCl grubu 76.0 ± 6.66 ve 5 mmol/kg grubu 99.0 ± 13.0 olarak hesaplandı. Bax seviyesinin 2 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede azaldığı gösterildi.



Şekil 6.8.7.3. Bcl-xL/Bax oranı. Anti-apoptotik Bcl-xL ekspresyonu pro-apoptotik Bax ekspresyonuna oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Ek olarak Bcl-xL ve Bax protein seviyelerinin birbirine olan oranları hesaplandı. Buna göre; kontrol grubu 1.0 ± 0.1 , 2 mmol/kg LiCl grubu 1.5 ± 0.2 ve 5 mmol/kg grubu 1.1 ± 0.1 olarak hesaplandı. Bu oranın 2 mmol/kg LiCl grubu istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede arttırdığı görüldü.

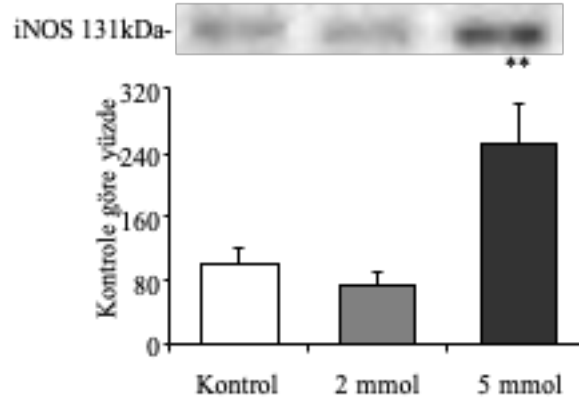
6.8.8. MMP-9 Protein Analizi



Şekil 6.8.8.1. MMP-9 protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda MMP-9 protein seviyesinin analizi yapılmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. **p<0.01/ *p<0.05 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde MMP-9 seviyesi hesaplandı. Hesaplamalar kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 7.9 , 2 mmol/kg LiCl grubu 81.0 ± 3.3 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 161.0 ± 7.5 olarak hesaplandı. MMP-9 seviyesinin 2 mmol/kg LiCl grubundakontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede azaldığı görüldü. Ayrıca 5 mmol/kg LiCl grubunda MMP-9 protein seviyesinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede arttığı gösterildi.

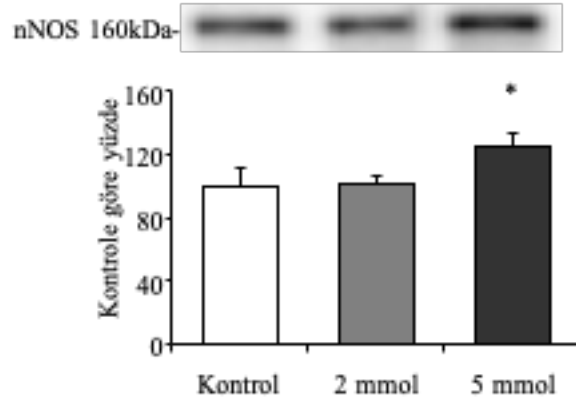
6.8.9. iNOS Protein Analizi



Şekil 6.8.9.1. iNOS protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iNOS protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde iNOS seviyesi hesaplandı. Protein ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 20.4 , 2 mmol/kg LiCl grubu 73.0 ± 15.6 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 251.0 ± 49.3 olarak hesaplandı. iNOS seviyesinin 2 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna kıyasla azaldığı görüldü. 5 mmol/kg LiCl grubunda iNOS protein seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede arttığı gösterildi.

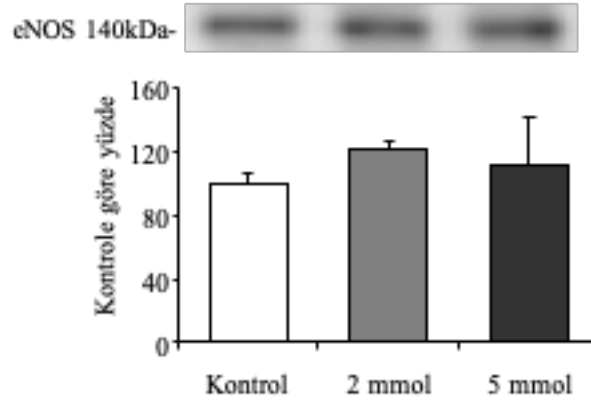
6.8.10. nNOS Protein Analizi



Şekil 6.8.10.1. nNOS protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda nNOS protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde nNOS seviyesi hesaplandı. nNOS protein seviyesinin ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 10.68 , 2 mmol/kg LiCl grubu 100.0 ± 5.98 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 126.0 ± 8.0 olarak hesaplandı. 5 mmol/kg LiCl grubunda nNOS protein seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede arttığı gösterildi.

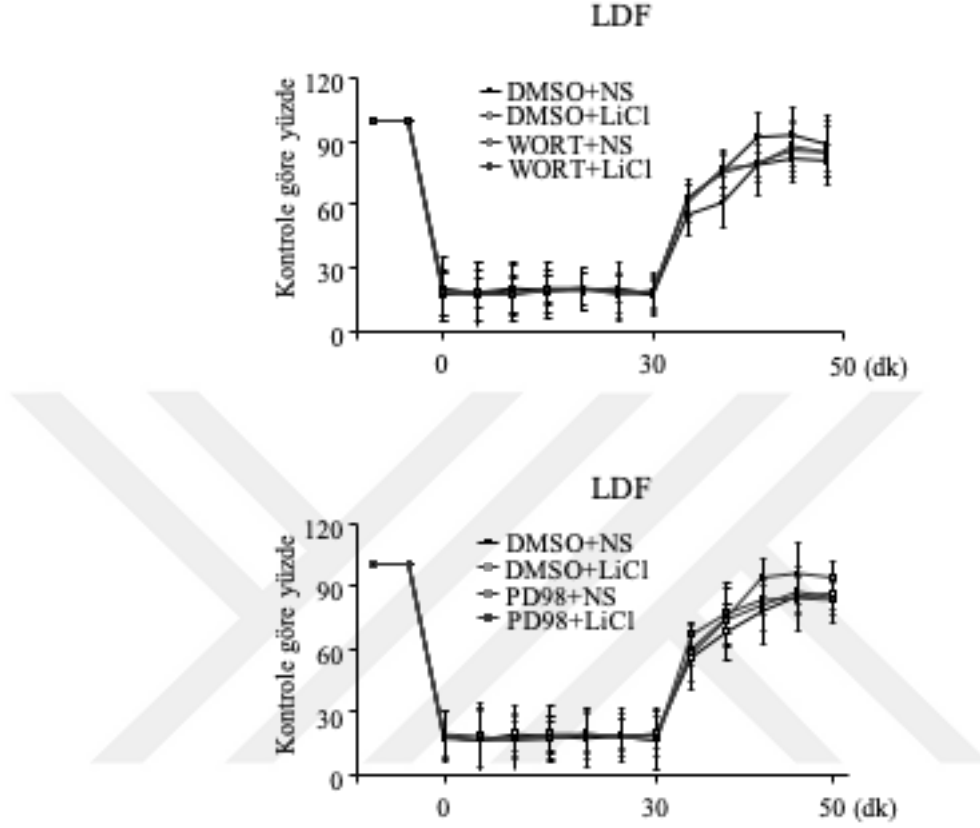
6.8.11. eNOS Protein Analizi



Şekil 6.8.11.1. eNOS protein seviyesi. 30 dakika OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon sonunda eNOS protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dakikalık iskemi modelini takiben 72 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyelerinden alınan dokularla yapılan protein analizinde eNOS seviyesi hesaplandı. eNOS protein seviyelerinin ölçümü kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; kontrol grubu 100.0 ± 5.3 , 2 mmol/kg LiCl grubu 122.0 ± 5.1 ve 5 mmol/kg LiCl grubu 111.0 ± 29.9 olarak hesaplandı. 2 mmol/kg LiCl grubunda eNOS protein seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gösterildi. Ek olarak 5 mmol/kg LiCl grubunda kontrol grubuna göre eNOS'un azaldığı görüldü.

6.9.İnhibitör Uygulanan Grupların 30 dk OSA Tıkanması Kan Akımı Kaydı

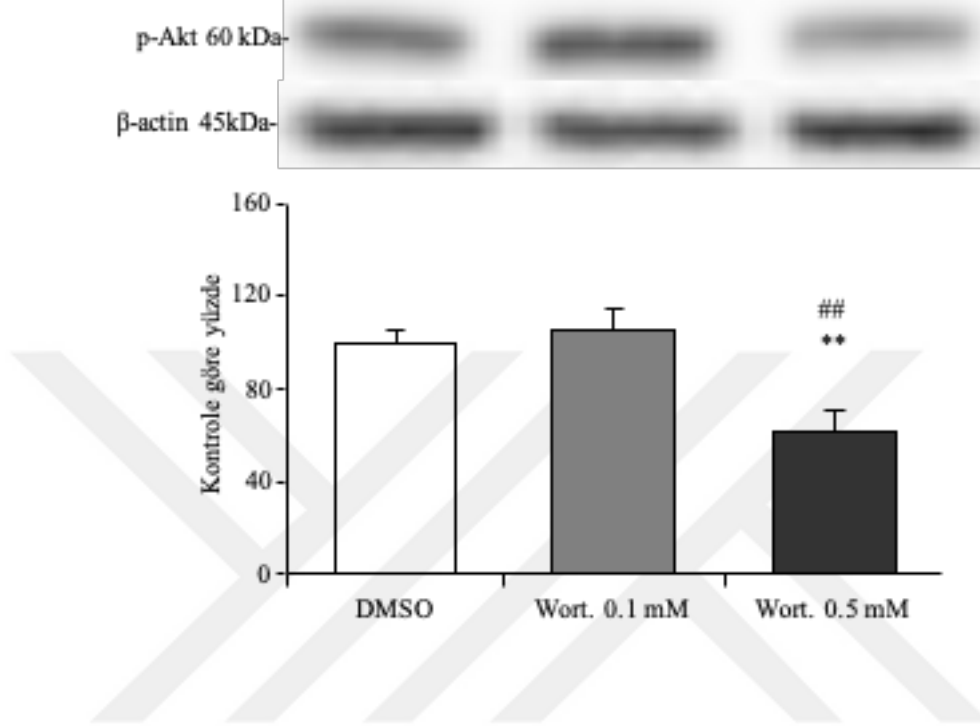


Şekil 6.9.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı Wortmannin enjeksiyonu yapılan grup (A), PD98059 enjeksiyonu yapılan grup (B). Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

30 dakikalık iskemi modelinin tekrar edilebilirliğini ve hayvan deneylerini başarısının kontrolü için orta serebral arterin beslediği striatum bölgesinden (Bregma – 2mm posterior; 6 mm lateral) cerebral iskemi boyunca LDF kaydı alındı. Orta serebral arter monofilament tekniği kullanılarak tılandıktan sonra beyin kan akımı operasyon öncesine oranla %80 düştü. 30 dakika boyunca beyin kan akımı operasyon öncesi sağlıklı beynin kan akımına göre %20'lik oranda kaldı. Monofilamentin geri çekilmesiyle birlikte kan akımı tekrar yükseldi. Reperfüzyon esnasından 15 dakika LDF kaydı alındı.

6.10. İnhibitör Uygulanan Grupların Western Blot Sonuçları

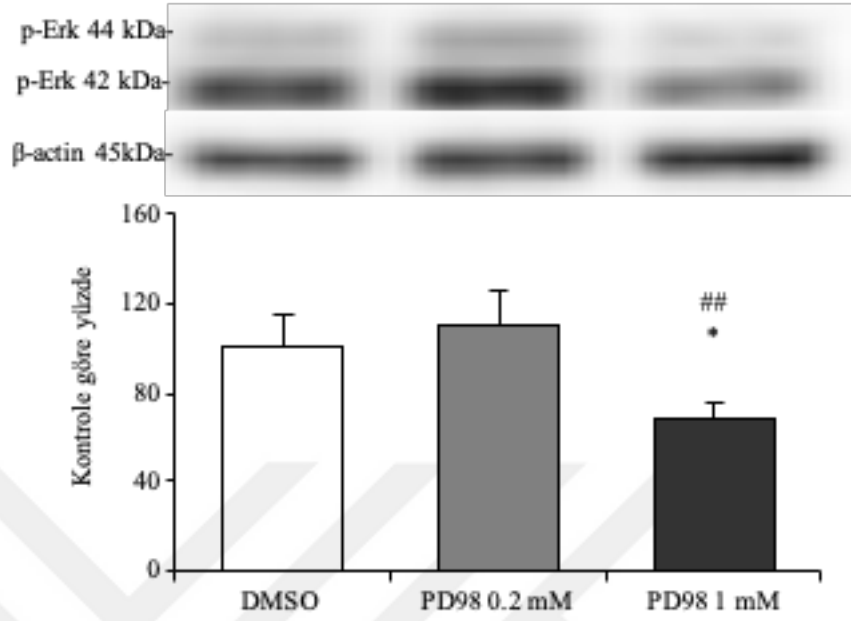
6.10.1. Wortmannin Gruplarında p-Akt Analizi



Şekil 6.10.1.1. P-Akt protein seviyesi. Wortmannin enjeksiyonunu takiben 30 dakika sonunda p-Akt protein seviyesi analiz edilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Spesifik Akt inhibitörü olan wortmannin dozunun belirlenebilmesi için dizayn edilen bu analizde 2 farklı wortmannin dozu striatuma enjekte edildi; 0.1 mM ve 0.5 mM. Kontrol olarak çözücü DMSO (Dimetil sulfoksit, A3672, AppliChem) kullanıldı. Bu farelerin enjeksiyon bölgelerinden alınan dokularda Akt fosforilasyonunun seviyelerine bakıldı. Ölçümler kontrol grubu olan DMSO grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; DMSO grubu 100.0 ± 5.2 , WORT 0.1 mM grubu 105.8 ± 8.1 ve WORT 0.5 mM grubu 62.0 ± 8.8 olarak hesaplandı. Akt fosforilasyonunu 0.5 mM Wortmanin enjeksiyonunun istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede azalttığı görüldü.

6.10.2. PD98059 Gruplarında p-ERK-1/-2 Analizi

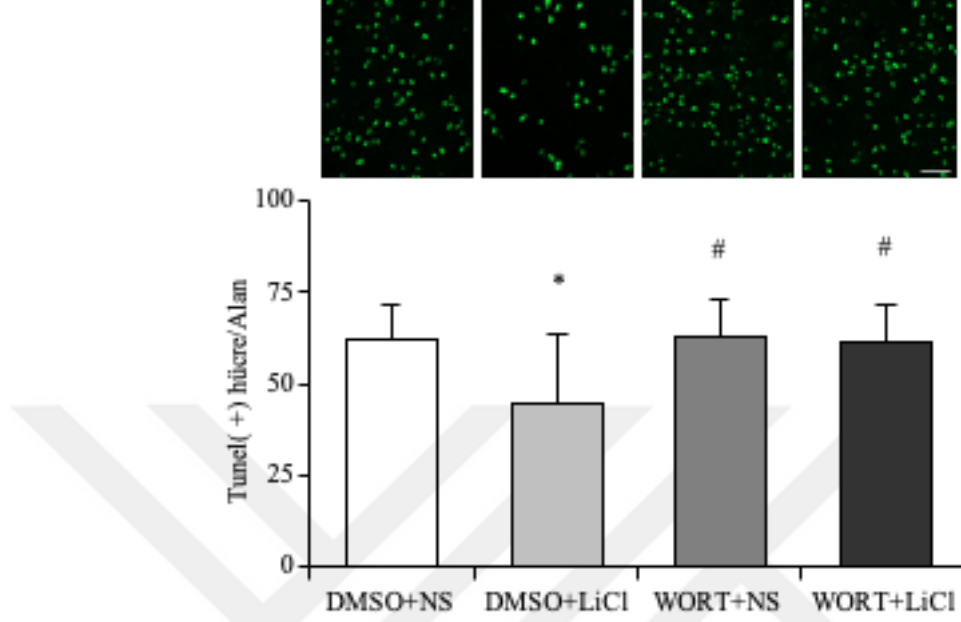


Şekil 6.10.2.1. P-ERK1/2 protein seviyesi. PD98059 enjeksiyonunu takiben 30 dakika sonunda p-ERK1/2 protein seviyesi analiz edilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

MAPK inhibitörü olan PD98059 dozunun belirlenebilmesi için dizayn edilen bu analizde 2 farklı PD98059 dozu striatuma enjekte edildi; 0.2 mM ve 1 mM. Kontrol olarak çözücü DMSO kullanıldı. Striatum seviyesinden alınan dokularda ERK-1/-2 fosforilasyonunun seviyelerine bakıldı. Protein ölçümleri kontrol grubuna oranlanarak verildi. Buna göre; DMSO grubu 100.0 ± 16.6 , PD98 0.2 mM grubu 110.8 ± 12.3 ve PD98 1 mM grubu 68.3 ± 7.1 olarak hesaplandı. ERK-1/-2 fosforilasyonunun PD98 1 mM grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede düştüğü görüldü.

6.11. İnhibitör Uygulanan Gruplarda DNA Fragmantasyonu Analizi

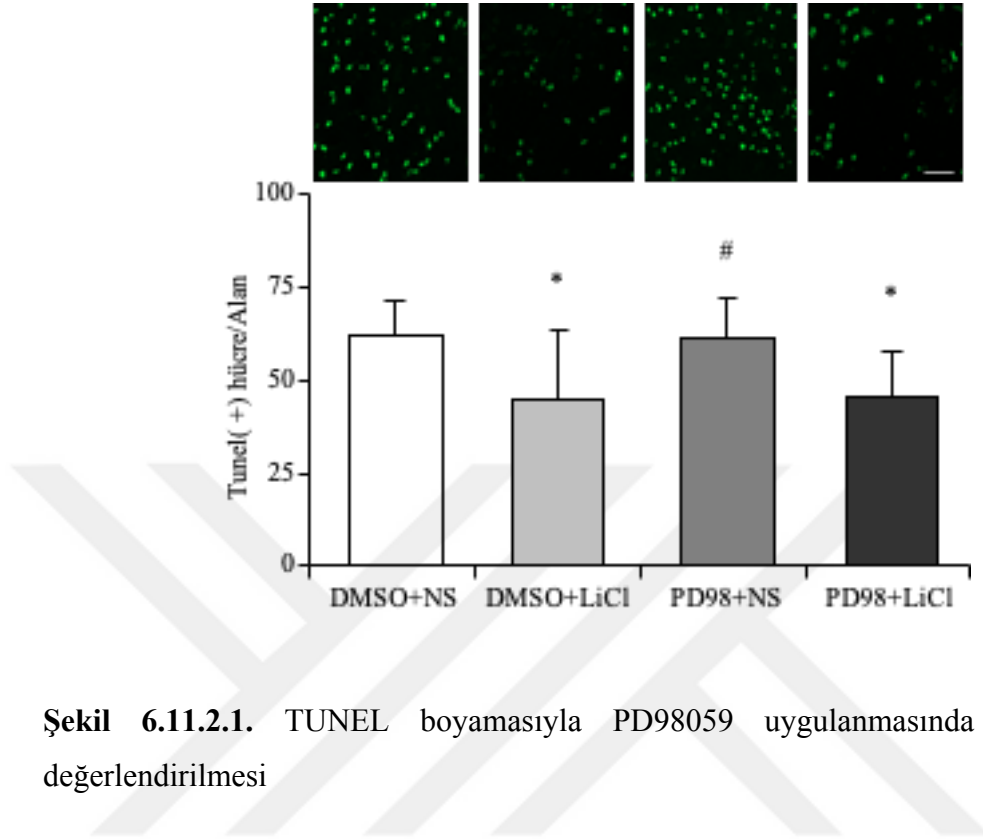
6.11.1. Wortmannin gruplarında TUNEL (+) Hücreler



Şekil 6.11.1.1. TUNEL boyaması ile Wortmannin uygulamasında apoptozun değerlendirilmesi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına spesifik PI3K/Akt inhibitörü Wortmannin enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere TUNEL boyaması yapıldı. İskemik striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan TUNEL (+) hücre sayımı yapıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama apoptotik hücre sayıları; DMSO + SF grubunda 61.9 ± 9.6 , DMSO + LiCl grubunda 44.6 ± 19.0 , WORT + SF grubunda 62.9 ± 10.6 ve WORT + LiCl 61.0 ± 10.9 olarak hesaplandı. Buna göre; DMSO + LiCl grubundaki farelerde apoptotik hücre sayısının kontrol grubu olan DMSO +SF ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede azaldığı gösterildi. Ek olarak WORT + LiCl grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim olmadığı gösterildi.

6.11.2. PD98059 gruplarında TUNEL (+) Hücreler

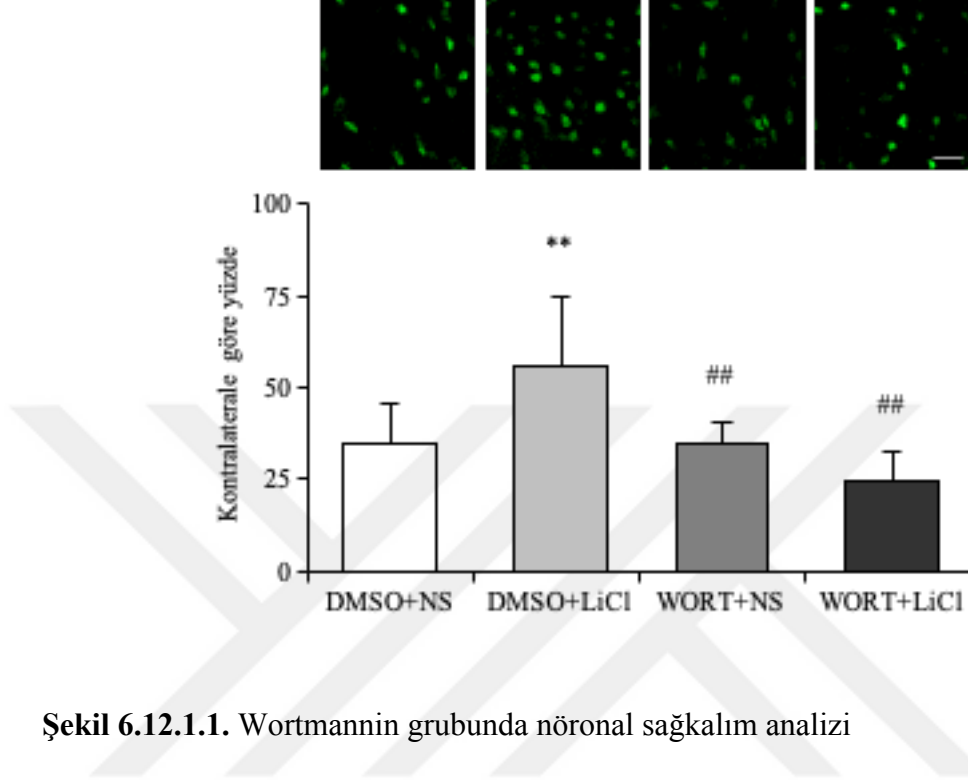


Şekil 6.11.2.1. TUNEL boyamasıyla PD98059 uygulanmasında apoptozun değerlendirilmesi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına spesifik MAPK inhibitörü PD98059 enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere TUNEL boyaması yapıldı. İskemik striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan TUNEL (+) hücre sayımı yapıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama apoptotik hücre sayıları; DMSO + SF grubunda 61.9 ± 9.6 , DMSO + LiCl grubunda 44.6 ± 19.0 , PD98 + SF grubunda 44.6 ± 19.0 ve PD98 + LiCl 45.7 ± 12.0 olarak hesaplandı. Buna göre; DMSO + LiCl grubundaki farelerde apoptotik hücre sayısının kontrol grubu olan DMSO +SF ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede azaldığı gösterildi. Ek olarak PD98 + LiCl grubunda DMSO + SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bir azalma görüldü.

6.12. İnhibitör Uygulanan Gruplarda Nöronal Sağkalım Analizi

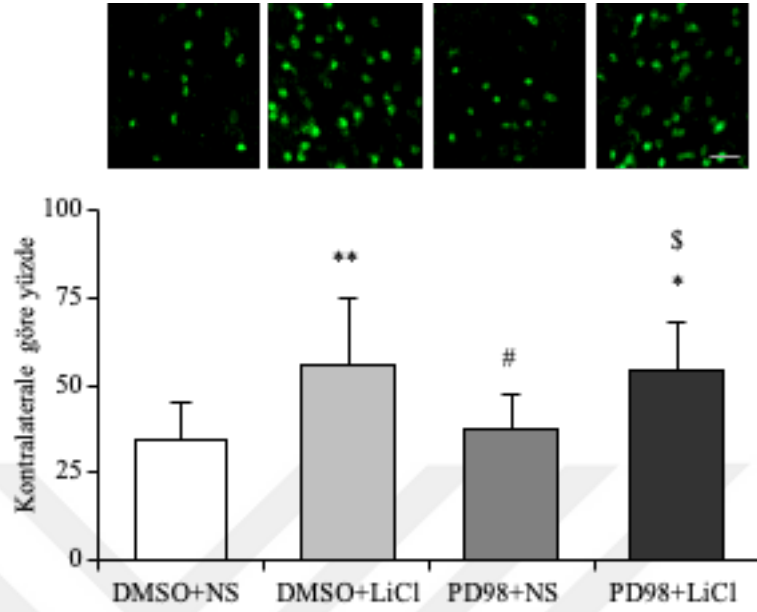
6.12.1. Wortmannin gruplarında NeUN (+) Hücreler



Şekil 6.12.1.1. Wortmannin grubunda nöronal sağkalım analizi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına PI3K/Akt inhibitörü Wortmannin enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere NeUN boyaması yapıldı. İskemik ve iskemik olmayan striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan NeUN (+) hücreler sayıldı. Nöronal sağkalım iskemik striatumun iskemik olmayan striatuma oranlanmasıyla ölçüldü. Buna göre; DMSO + SF grubu 34.6 ± 10.8 , DMSO + LiCl grubu 56 ± 18.8 , WORT + SF grubu 34.7 ± 6.1 ve WORT + LiCl grubu 24.47 ± 7.6 olarak hesaplandı. DMSO + LiCl grubundaki nöronal sağkalımın DMSO + SF grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede arttığı görüldü. Ek olarak WORT + LiCl grubunda DMSO + SF grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülmedi.

6.12.2. PD98059 gruplarında NeUN (+) Hücreler

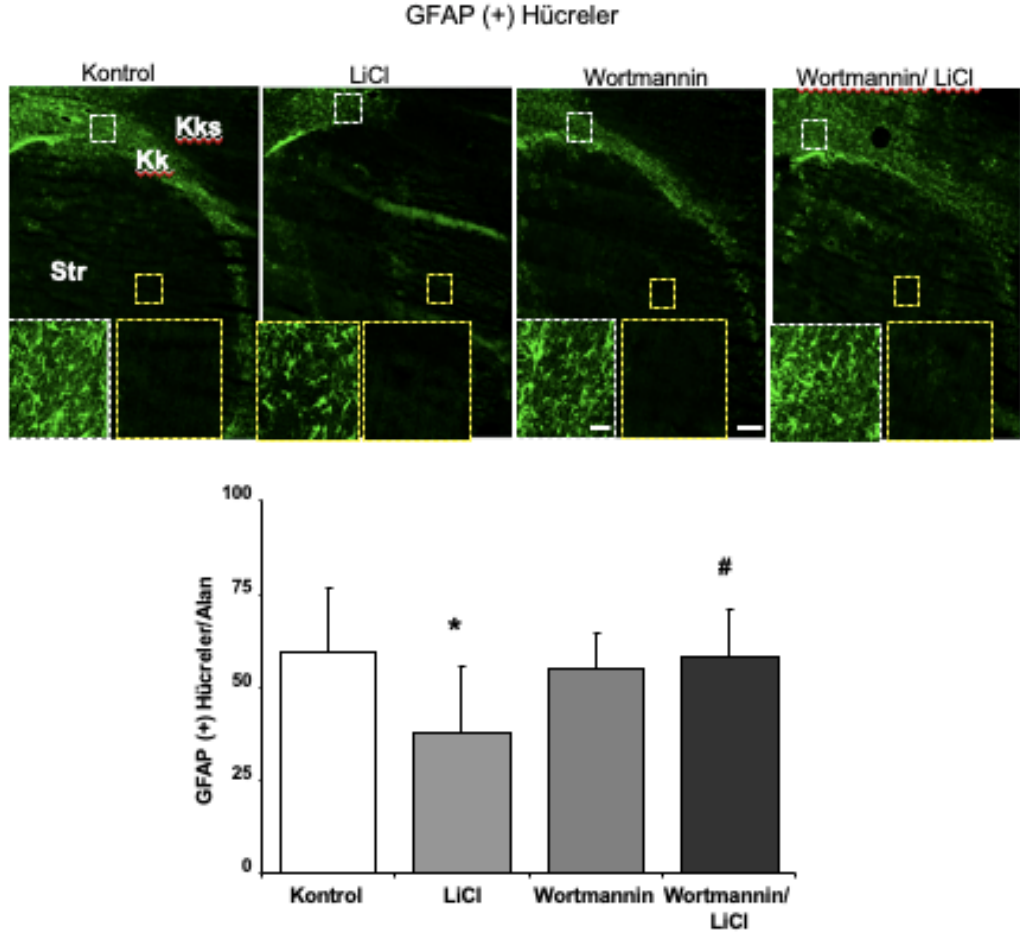


Şekil 6.12.2.1. PD98059 grubunda nöronal sağkalım analizi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına MAPK inhibitörü PD98059 enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere NeUN boyaması yapıldı. İskemik ve iskemik olmayan striatumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 9 farklı alandan NeUN (+) hücreler sayıldı. Nöronal sağkalım iskemik striatumun iskemik olmayan striatuma oranlanmasıyla ölçüldü. Buna göre; DMSO + SF grubu 34.6 ± 10.8 , DMSO + LiCl grubu 56 ± 18.8 , PD98 + SF grubu 37.4 ± 10.8 ve PD98 + LiCl grubu 54.0 ± 13.8 olarak hesaplandı. DMSO + LiCl grubundaki nöronal sağkalımın DMSO + SF grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede arttığı görüldü. Ek olarak PD98 + LiCl grubunda DMSO + SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede bir artış olduğu görüldü.

6.13. İnhibitör Uygulanan Gruplarda Glial Hücre Analizi

6.13.1. Wortmannin Gruplarında GFAP (+) Hücreler

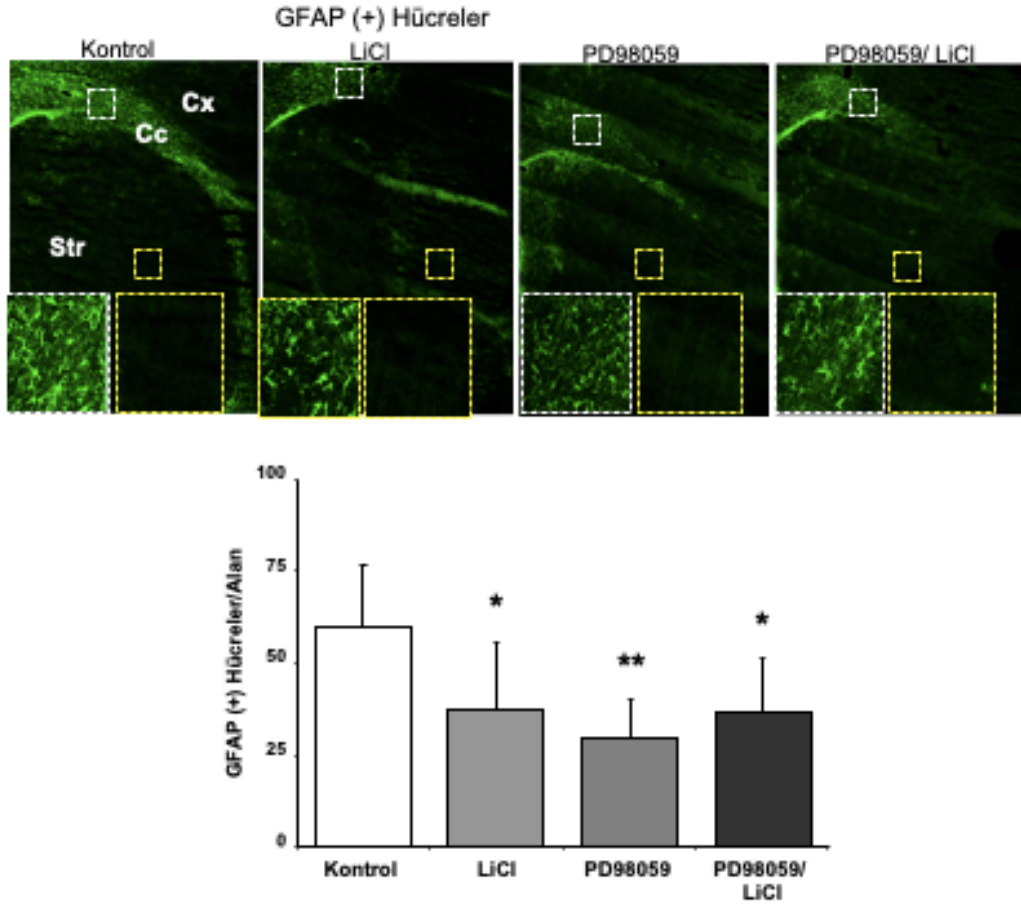


Şekil 6.13.2.1. Wortmannin grubunda glial hücre analizi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına Akt inhibitörü Wortmannin enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere GFAP boyaması yapıldı. İskemik striatumda ve korpus kallosumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 18 farklı alandan GFAP (+) hücreler sayıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama glial hücre sayıları; DMSO + SF grubu 59.67 ± 17.13 , DMSO + LiCl grubu 37.67 ± 17.8 , WORT + SF grubu 54.8 ± 10.01 ve WORT + LiCl grubu 58.13 ± 13.23 olarak hesaplandı. DMSO + LiCl grubundaki glial hücre sayısının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.05$)

anamlı derecede azaldığı görüldü. Ek olarak WORT + LiCl grubunda DMSO + LiCl grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede bir artış olduğu görüldü.

6.13.2. PD98059 Gruplarında GFAP (+) Hücreler



Şekil 6.13.1.1. PD98059 grubunda glial hücre analizi

30 dakikalık iskemi modelinin indüklenmesinden önce farelerin striatumlarına MAPK inhibitörü PD98059 enjeksiyonu yapıldı ve lityum tedavisi uygulandı. Bu farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal kesitlere GFAP boyaması yapıldı. İskemik striatum ve korpus kallosumda $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik 18 farklı alandan GFAP (+) hücreler sayıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama glial hücre sayıları; DMSO + SF grubu 34.6 ± 10.8 , DMSO + LiCl grubu 56 ± 18.8 , PD98 + SF grubu 29.6 ± 10.62 ve

PD98 + LiCl grubu 36.4 ± 14.9 olarak hesaplandı. DMSO + LiCl grubundaki glial hücre sayısının DMSO + SF grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede azaldığı görüldü. Ek olarak PD98 + SF grubunda ($p < 0.01$) ve PD98 + LiCl grubunda ($p < 0.05$) DMSO + SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma olduğu görüldü.



7. TARTIŞMA

Bu tezde lityumun *in vivo* şartlarda beyin felci sonrası gelişen hasar üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda insanlardaki inme vakalarının da %80'ini oluşturan orta serebral arter tıkanıklığı modeli kullanılmıştır.

İki farklı iskemi zamanlaması kullanılarak, lityumun 30 ve 90 dakika serebral iskemi modellerindeki etkileri incelenmiştir. Hasarın neredeyse tüm hemisfere yayıldığı 90 dakika OSA tıkanması geçiren farelerde iskemi bitiminden hemen sonra reperfüzyon ile birlikte intraperitoneal lityum enjeksiyonu yapılmıştır. Hasarın tamamlandığı 24. saatte fareler sakrifiye edilmiştir ve beyin örnekleri alınmıştır. Lityumun nörolojik hasar, beyin hasar alanı ve ödemi, kan-beyin bariyeri geçirgenliği üzerine olan etkileri incelenmiştir. Hasarın striatumla sınırlı kaldığı 30 dakikalık OSA modelinde lityum yine reperfüzyonun başlatılması ile birlikte intraperitoneal olarak verilmiştir. Hasarın tamamlandığı 72. saatte fareler sakrifiye edilmiştir ve beyin örnekleri alınmıştır. Lityumun hasar alanındaki apoptotik hücre ölümü, nöronal sağkalım ve ilgili protein ekspresyonları üzerine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler ile lityumun nöroprotektif etkisinin PI3K/Akt veya MAPK sinyal yolağından ileri geldiği düşünülmüş ve bu mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi için spesifik Akt ve ERK inhibitörlerinin kullanıldığı üçüncü deney seti dizayn edilmiştir. 30 dakika OSA tıkanması modelinin kullanıldığı farelerde Akt ve ERK fosforilasyonunun inhibe edildiği ortamda lityumun apoptotik hücre ölümü ve nöronal sağkalıma etkileri incelenmiştir.

Operasyonların tekrar edilebilirliğini ve iskeminin belirlenen süreler ile sınırlandırılmasının kontrolü için hayvanların beyin kan akımları LDF cihazı ile kontrol edilmiştir. Bu metot ile mutlak bir bölgesel kanlanma ölçümü elde edilemese de non-invazif ve devamlı olarak beyindeki küçük bir bölgenin anlık kan akımı değişiklikleri takip edilebilmektedir [156, 157]. Tüm deney setlerinde beyin kanlanması iskemi öncesine göre yaklaşık %80'lik düşüş göstermiştir. İskemi sonrasındaki reperfüzyonun başlamasıyla kanlanma tekrar %100 seviyelerine

çıkıştır. Reperfüzyondaki kanlanma değerlerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir. Kanlanmadaki bu benzerlik ile lityum uygulanan hayvanlarda gelişmiş olan hasarda deneysel bir farklılık olmadığı düşünülmektedir. Böylelikle elde edilen sonuçların lityum tedavisi kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Lityum tedavisinin beyin felci sonrası gelişen nörolojik durum, hasar alanı, sitotoksik ödem ve KBB geçirgenliğine etkisini incelemek için 90 dk OSA tıkanmasını takiben reperfüzyon modeli kullanılmıştır. Ratlarda iskemiden 24 ve 48 saat sonra yapılan analizlerde lityumun nörolojik defisitleri azalttığı görülmüştür [109]. Hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce dört puanlı nörolojik skorlamaya tabi tutulmuştur. Yapılan değerlendirmelerde beyin felci sonrası 2 mmol/kg lityum tedavisi uygulanan farelerin nörolojik fonksiyonlarının taşıyıcı enjeksiyonu yapılan farelere göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan 5 mmol/kg lityum tedavisinin farelerin nörolojik davranışlarına etki etmediği görülmüştür.

Beyin damarlarından OSA'nın tıkanması ile birlikte hasar alanında kısa bir süre içinde hücre ölümü başlamaktadır. Geri döndürülemez olan bu hasar mekanizmasını incelemek için 90 dakikalık tıkanıklık modeli kullanılmaktadır [158, 159]. Beyin felci sonrasında sitotoksik ödem ve hasar alanının belirlenebilmesi için, sakrifiye edilen farelerden 2 mm aralıklarla alınan koronal kesitlerde Cresyl violet boyaması yapılmıştır. Cresyl violet boyaması ile canlı hücrelerdeki nissyl cisimcikleri boyanırken ölü hücreler boyanmamıştır. Sadece nöronların boyandığı bu boyama ile kesitlerdeki hemisfer, korteks, korpus kallozum ve striatum alanları ölçülebilmektedir. Taşıyıcı enjeksiyonunun yapıldığı kontrol grubuna kıyasla 2 mmol/kg lityum tedavisi farelerde hasar alanını anlamlı derecede düşürmüştür. 5 mmol/kg lityum tedavisi uygulanan hayvanlarda ise bir fark görülmemiştir.

Glutamat reseptörlerinin uyarılmasıyla hücre içine Na^{+1} pozitif yüklü iyonu ile birlikte Cl^{-1} iyonu girmektedir [15]. Hücre içinde oluşan tuz nedeniyle ekstraselüler sıvıdan hücre içine yüksek miktarda su girişi olmaktadır. Artan su, hücrelerin şişmesine sebep olarak sitotoksik ödem oluşturmaktadır [15, 160]. 2 mmol/kg lityum

tedavisi bu ödemi taşıyıcı grubuna göre azaltmaktadır. Ancak 5 mmol/kg lityum tedavi grubunda bir değişiklik görülmemektedir.

KBB, merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonu için gerekli olan, yapısal olarak sıkı bağlar (*tight junctions*) ile birbirine bağlanmış endotel hücreler tarafından oluşturulan bir difüzyon bariyeridir [161, 162]. Endotelyal hücre sıkı bağlantıları, dolaşımdaki hidrofilik ve büyük moleküllerin BBB boyunca paraselüler akışını sınırlayarak homeostaza önemli katkıda bulunmaktadır [163-165]. Buna karşın, O₂ ve CO₂ gibi küçük lipofilik maddeler, konsantrasyon gradyanları boyunca plazma membranlarından difuz olabilmektedir [161]. Beyin felci gibi patofizyolojik durumlarda bu bariyer bozulabilmektedir [162]. Sakrifiye edilen farelerden alınan koronal kesitlerde IgG boyaması yapılmıştır. Bu boyama ile KBB geçirgenliğindeki bozulma ipsilateral hemisferin kontralateral hemisfere oranlanması ile analiz edilmiştir. Striatumda yapılan değerlendirmelerde 2 mmol/kg lityum tedavisinin KBB geçirgenliğini taşıyıcı gruba göre azalttığı gözlemlenmiştir. Kortekste yapılan değerlendirmelerde 2 mmol/kg lityum tedavisi bariyer geçirgenliğini taşıyıcı gruba göre korumaktadır. Her iki alanda da 5 mmol/kg lityum tedavisinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Serebral iskemi reperfüzyon sürecini takiben serbest oksijen radikalleri, oksidatif stres, glutamat toksisitesi, aşırı Ca⁺² yüklenmesi ve NO sentezi gibi çeşitli hasar faktörleri oluşmaktadır. Akut iskemik inmenin patogenezinde, akut iskemik kaskad reaksiyonu, enerji metabolizması bozuklukları, oksidatif stres veya vücudun oksidatif savunmasının inhibisyonu beyin hücrelerine zarar vererek hipokampus ve kortekste nöronal apoptoza, nekroza veya nöron kaybına yol açmaktadır [48, 54-56, 166, 167]. Apoptotik hücre ölümü hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi çeşitli yollarla tetiklenmektedir [46]. Glutamat, serebral iskeminin neden olduğu eksitotoksositeye ve ardından gelişen apoptoz/nekroza önemli bir katkıda bulunmaktadır [168, 169]. İskemi sonrası gelişen enerji eksikliği glutamat salınımının artarak sinaptik aralıkta birikmesine sebep olmaktadır [170-175]. Bu da nöronlarda yoğun Ca²⁺ akışına ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır [176, 177]. Nöronal Ca²⁺ artışı, lizozomla ilişkili

apoptoz ve nekrozun bir sonucu olarak apoptotik düzenleyici proteinleri (kaspaz ailesi) parçalamak için kalpainleri (kalsiyuma bağlı proteazlar) daha da aktive etmektedir [178-181]. Kaspaz genlerinin yanı sıra hücre ölümünü baskılayan (Bcl2, Iap) veya arttıran (Bax, p53) genler de iskeminin erken ve geç evrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir [15]. 30 dakika OSA tıkanması 72 saat reperfüzyon modeli uygulanan farelerden nöronal hasar mekanizmalarının incelenmesi için alınan kesitlerde TUNEL boyaması yapıldı. Apoptotik hücre analizinin yapılabilmesi için kesitlerdeki TUNEL (+) hücreler sayılarak değerlendirildi. Beyin felci sonrası uygulanan 2 mmol/kg dozundaki lityum tedavisi apoptotik hücre ölümünü anlamlı derecede düşürmektedir. 5mmol/kg lityum tedavisi uygulanan fare grubunda taşıyıcı grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi.

Lityumun serebral iskemi sonrası nöronal sağkalım üzerine olan etkilerinin incelenmesi için 30 dakika OSA tıkanması 72 saat reperfüzyon modeli uygulanan fare kesitlerine NeUN boyaması yapıldı. NeUN (+) hücreler iskemik ve iskemik olmayan striatumlarda sayılarak iskemik olmayan striatuma yüzde alınarak ifade edildi. Yapılan analizler neticesinde 2 mmol/kg lityum tedavisi nöronal sağkalımı taşıyıcı grubuna kıyasla anlamlı derecede artırırken 5 mmol/kg lityum uygulamasında yine taşıyıcı grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi. Lityumun serebral iskemi sonrası apoptoz ve nöronal sağkalım üzerine olan etkilerinin birbirini tamamlar nitelikte olduğu görülmektedir.

Lityum tedavilerinin hücre içi sinyal yolları analizleri için Western Blot tekniği kullanılmıştır. Serin-tirozin kinaz olan Akt serebral iskemi gibi çeşitli patofizyolojik durumlarda nöronal hasar mekanizmasında önemli bir role sahiptir [182]. Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt, siklik adenozin monofosfata (cAMP) bağlı protein kinaz süper ailesine ait bir serin/treonin kinazdır [183]. Akt'nin aktivasyonu insülin, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücrel stres gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Sinyal iletim yolları, besin metabolizması, çoğalma, hücre büyümesi, transkripsiyonel düzenleme ve hücre sağkalımı gibi biyolojik işlevleri düzenlemektedir [184]. Tüm Akt izoformları sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilmektedir ve nöron korunmasında önemli rol oynamaktadır. Aktif

aktivasyon ölçümü, Ser473 veya Thr308'den fosforile edilmiş Akt'nin toplam membranla ilişkili fosfodan bağımsız Akt'ye oranı ile hesaplanmaktadır. Aktif fosforile edilmiş Akt aşağı akış substratlarının fosforilasyonunu arttırarak nöronal hücre sağkalımını desteklediği bilinmektedir [185]. Akt'nin sinyalizasyondaki rolü, insülin veya diğer büyüme faktörleri gibi ligandlar tarafından indüklenen, reseptör tirozin kinazların otofosforilasyonu, G protein-bağlı reseptörlerin uyarılması veya integrin sinyalizasyonunun aktivasyonunda aktif olan fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K) sinyal yolağının aşağı akışında yer almasıyla önemli hale gelmektedir [186-189]. PI3K, fosfatidilinozitol-4,5-Bifosfattan (PIP2) ikinci haberci fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfatın (PIP3) oluşumunda önemli bir bileşendir. Akt plazma zarına alındıktan sonra kinaz alanının aktivasyonunda Thr308 ve Ser473'ün fosforilasyonu ile sonuçlanan çok aşamalı bir işlemle aktive edilmektedir [190, 191]. 30 dakikalık OSA tıkanması uygulanan farelerde 2 mmol/kg lityum uygulaması iskemik striatumlardaki fosforlanmış Akt miktarını taşıyıcı gruba göre anlamlı derecede arttırmıştır. 5 mmol/kg lityum tedavisi uygulanan farelerde ise kontrol grubuna göre Akt fosforilasyonunun anlamlı derecede düştüğü görüşmüştür.

Akt'nin aşağı akışta iyi belirlenmiş bir hedefi glikojen sentaz kinaz 3 betadır (GSK3 β). Yapılan bir çalışmada GSK3 β 'nin farmakolojik ya da baskın-negatif formunun ekspre edilmesinin nörotoksisiteye karşı koruma sağladığı görülmüştür. Ayrıca GSK3 β 'nin aktivasyonu farklı nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynamıştır ve bu kinazın inhibisyonunun bu bozuklukların tedavisine bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir[192]. Lityum tedavisi ile GSK3 α/β 'nin 2 mmol/kg ve 5 mmol/kg dozlarında kontrol grubuna göre azalttığı görülmüştür. GSK3 β 'nin nöron ölümünü teşvik etmede kilit bir rol oynadığı uzun süredir kabul edilmesine rağmen, substratlarının nörodejenerasyon bağlamında ne olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir [193].

Mitojenle etkileşen protein kinazlar (MAPK), birçok hücre tipinde çeşitli hücresel fonksiyonları destekleyen serin/treonin protein kinazlardır. Literatürde üç ana MAPK alt ailesi tarif edilmiştir; hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1 ve 2 (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal kinazlar (JNK) ve p38 kinazlar. JNK/SAPK (stresle

aktive olan protein kinaz) ve p38 MAP kinazlarının hücre ölümünü desteklediği buna karşın ERK1/2'nin hücre sağkalımını desteklediği yaygın olarak kabul edilmektedir. ERK1/2, nörotransmitterler, nörotrofinler, büyüme faktörü ve iskemi gibi patolojik koşullara yanıt olarak treonin ve tirozin bölgelerinden fosforile edilerek aktifleşmektedir [117, 194-199]. Hücrenin regülasyonunda, büyümesinde, çoğalmasında, farklılaşmasında, apoptozda, plastisitede, öğrenme ve hafıza rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur [200-203]. Ancak yapılan farklı çalışmalarda nöronal ölümün hem *in vitro* hem *in vivo* modellerinde ERK1/2 için hücre ölümünü teşvik edici rolleri de gösterilmiştir. MAPK'ların yeni bir üyesi olan ERK5 (MAPK1, BMK1) de tanımlanmış ve nöronal sağkalım ilişkileri incelenmiştir [204]. Serebral iskemi sonrası ani ERK5 aktivasyonu hipokampal kornuammonis (CA3) ve dentat girus bölgelerinde tanımlanmıştır [205]. Medullablastoma hücrelerinde ERK5'in aşırı ekspresyonunun apoptotik hücre ölümünü desteklediği gösterilmiştir [206]. ERK1/2'yi içeren farmakolojik çalışmaların çoğu PD98059 veya U0126 (MAPK/ERK kinaz (MEK) inhibitörü) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu inhibitörlerin her ikisi de ERK5 aktivasyonunu da inhibe etmektedir [207]. Bu nedenle ERK5'in ERK1/2 ile ilişkili hücre ölüm/sağkalım paradigmlarında da yer alıp almadığı görülmeye devam etmektedir [208]. Serebral iskemi sonrası uygulanan her iki doz lityum tedavisi kontrol grubuna göre ERK1/2 fosforilasyonunu anlamlı derecede artırırken JNK fosforilasyonunu azaltmıştır. Yapılan bir *in vitro* çalışmada JNK'nin nöronlardaki apoptoz ve dejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir [209]. Bununla birlikte lityum tedavisiyle doza bağımlı bir şekilde p-38 fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış görülmüştür.

Bcl-2 ailesinin proteinleri olan anti-apoptotik Bcl-xL ve pro-apoptotik Bax hücre içi apoptotik sinyal iletim yolunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [210]. Düşük doz (2 mmol/kg) lityum tedavisinin iskemi sonrası Bax ekspresyonunu azaltırken nöron koruyucu etkileri olan Bcl-xL düzeyini kontrol grubuna göre arttırmıştır. Ayrıca apoptozun blokajını gösteren Bcl-xL/Bax oranında da önemli bir artış 2 mmol/kg lityum tedavisiyle görülmüştür.

2 mmol/kg lityum tedavisi 90 dakika OSA tıkanmasına maruz bırakılan farelerde hem striatumda hem de kortekste beyin ödemi ve IgG ekstravazasyonunu

azaltmaktadır. Bu bulguları Western blot analizi ile desteklemek için MMP-9 ekspresyonu incelenmiştir. MMP-9 iskemik inmede farklı rollere sahip çinko bağımlı endopeptidazlar ailesinin bir üyesidir [211]. MMP seviyelerinin, özellikle MMP-2 ve 9, serebral iskemiyi takiben arttığı daha önce gösterilmiştir. Bu da sıkı bağlantıların ve bazal lamina proteinlerinin bozulmasına, hücre matris homeostazının bozulmasına ve KBB bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır [211, 212]. Kemirgenlerdeki iskemik inme modellerinde, MMP-9 serebral iskemiden 24 ila 48 saat sonra meydana gelen KBB bütünlüğünün bozulmasından sorumludur[213]. 2 mmol/kg lityum tedavisi uygulanan fare grubunda MMP-9 ekspresyonunun düştüğü, 5 mmol/kg lityum dozunda ise arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç lityum tedavisinin doza bağımlı aktivitesi ile ilişkili olan yüksek dozda lityumun toksik etkisini göstermektedir.

Oksidatif strese özellikle sorumlu olan reaktif oksijen türleri (ROS), iskemi tarafından indüklenen nitrik oksiti (NO) içermektedir. Nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) aktiviteleri iskemi sonrasında büyük ölçüde zararlı olduğu ve inhibisyonlarının nöron koruyucu olduğu literatürde ifade edilmiştir [214]. Her ikisi de lipid peroksidasyonuna ve hücrel enerji yetmezliğine katkıda bulunmaktadır [215]. İskemi sonrası aktive olan astrositler, toksik miktarda NO üreten bir enzim olan sitokinleri, kemokinleri ve iNOS'u eksprese etmektedir. Bu sitotoksik faktörler, KBB'nin bozulmasıyla daha fazla hücrel hasara yol açarak beyin hasarının ve ödeminin artmasına neden olmaktadır [15, 216]. 5 mmol/kg lityum tedavisi ile hem iNOS hemde nNOS ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir. Lityumun yüksek dozunun KBB geçirgenliğini ve iNOS düzeyini artırarak beyin ödemi alevlendirici toksik etkisi önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ek olarak endotelial NOS'un (eNOS) yukarı regülasyonunun PI3K yolu tarafından tetiklendiğini ve hem eNOS hem de PI3K'nın gerbil hipokampusunun CA1 nöronlarında iskemik tolerans sağladığı da gösterilmiştir [217]. Her iki dozdaki lityum tedavisi ile eNOS ekspresyonu artış göstermiştir. Bu bağlamda eNOS seviyesi, PI3K/Akt sinyal iletim yolunun aktivasyonu ile ilişkili olabilir ve beyin mikro dolaşımını iyileştirebilmektedir.

Memelilerde PI3K/Akt aracılı sinyalleme hücre sağkalımı, çoğalma ve metabolizmada yer alan kritik bir sinyal yolağıdır [218]. Serebral iskemi esnasında

Akt fosforilasyonu, endojen koruma mekanizmasının bir parçası olarak özellikle penumbra artmaktadır [219]. Ayrıca fosforile olmuş Akt büyüme faktörü ve serbest radikal tedavisi ile de arttırılmaktadır [183, 220-223]. Böylelikle PI3K/Akt sinyal yolağı nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde hücre sağkalımı için hedef olabilmektedir [219, 223]. Esas olarak Akt, PIP3 sinyal yolağıyla regüle edilmektedir ve PI3K tarafından olan fosforilasyonu potansiyel PIP3 inhibitörü olan Wortmannin ile inhibe edilebilmektedir [220]. Akt, Ca²⁺/calmodulin bağımlı kinaz ve CAMP/PKA gibi farklı birkaç farklı yolakla da aktive edilebilmektedir. Bu nedenle tüm Akt fosforilasyonu PIP3'e bağılı olmayan alternatif mekanizmalardan dolayı Wortmannin ile inhibe edilememektedir [183]. İki farklı Wortmannin dozunun uygulandığı fare beyinlerinden yapılan protein analizlerinde 0.5 mM Wortmannin'in Akt fosforilasyonunu taşıyıcısına göre anlamlı derecede düşürdüğü görüldü ve inhibisyon konsantrasyonu bu şekilde belirlendi. Lityum tedavisi ile arttığını gösterdiğimiz Akt fosforilasyonunun mekanizmasını anlayabilmek için PI3K/Akt inhibitörü olan Wortmannin uygulanmış fareler 30 dakika OSA tıkanmasına maruz bırakıldı. Bu hayvanların beyinlerinden alınan kesitlerde yapılan apoptotik hücre ve nöronal sağkalım analizlerinde Akt fosforilasyonunun lityumun nöron koruyucu etkisine aracılık ettiği görüldü. Akt fosforilasyonunun inhibe edilmediği hayvanlarda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna göre azaldığı nöronal sağ kalımın ise arttığı görüldü. Buna karşın Akt'nin fosforile edilemediği hayvan kesitlerinde lityum aynı etkileri gösteremedi.

Gliyal hücreler, merkezi sinir sisteminin (MSS) kritik bileşenlerinden biridir. Astrositler gliyal hücrelerin %19-40'ını oluştururken, mikroglialar %10'unu, oligodendrositler %45-75'ini oluşturmaktadır ve geri kalan hücreler NG2 hücreleridir. Gliyal hücreler, yapısal ve beslenme desteği sağlarken normal fizyolojik koşullar altında da MSS'nin gelişiminde rol oynar. Ayrıca doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerine katıldıkları için nöropatogeneze ve patolojik koşullarda da önemlidirler. Çalışmalar, gliyal hücrelerin inme sonrası nöroinflamasyonu düzenlediğini göstermektedir. Bu hücreler, nöronal hasar sinyallerini saptayıp entegre edebilmektedir. Sitokinleri serbest bırakabilir, bağışıklık hücrelerini hasar bölgesine

çekebilir ve diğer bağışıklık hücreleriyle etkileşime girip onların durumunu etkileyebilmektedirler [224].

İnmenin başlamasından sonra, yaralanma bölgesindeki nöronlar ve glial hücreler astrositleri hemen aktive etmektedir. Reaktif astrositler, daha sonra kan-beyin bariyerini (BBB) bozan MMP-9 gibi proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve matris metalloproteinazları salgılamaktadırlar. Bu da ikincil beyin dokusu hasarına katkıda bulunmaktadır [224].

Lityumun serebral iskemi sonrası glial hücre sayısına üzerine olan etkilerinin incelenmesi için inhibitör enjeksiyonu sonrası 30 dakika OSA tıkanması 72 saat reperfüzyon modeli uygulanan fare kesitlerine GFAP boyaması yapıldı. GFAP (+) hücreler iskemik striatum ve korpus kallosumda belirlenen alanlarda sayıldı. Yapılan analizler neticesinde lityum tedavisi uygulanan hayvanlardaki glial hücre sayısı taşıyıcı grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken Wortmannin uygulanan hayvanlarda lityum bu etkiyi gösterememektedir. Bununla birlikte PD98059 enjeksiyonu uygulanan fare beyinlerindeki glial hücrelerde lityum grubuna kıyasla değişiklik saptanmamaktadır. Yani lityum ERK'ların inhibe edildiği ortamda da glia hücreleri üzerine olan etkisini devam ettirebilmektedir.

Lityumun yüksek ve düşük dozlarda serebral iskemiden sonra ERK1/2 fosforilasyonunu arttırdığını gösterildi. MAPK/ERK sinyal yolağının lityum tedavisindeki rolünü incelemek için ERK1/2 spesifik MAPK inhibitörü olan PD98059 ile inhibe edildi. İki farklı PD98059 dozu uygulanan fare beyinlerinden yapılan protein çalışmalarında 1 mM PD98059 uygulanan fare beyin dokularındaki ERK1/2 fosforilasyonunun taşıyıcı grubuna göre anlamlı derecede düştüğü görüldü ve inhibisyon için bu doz kullanıldı. Serebral iskemi öncesi ERK1/2'nin inhibe edildiği hayvanlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi. ERK'ların inhibe edildiği beyinlerde de taşıyıcı grubuyla benzer apoptoz ve nöronal sağkalım seviyeleri görüldü. Bu sonuçlar lityumun nöron hasarı üzerine olan pozitif etkilerinin ERK1/2'den bağımsız bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

8. SONUÇ

Tüm bu veriler birlikte incelendiğinde serebral iskemi sonrası uygulanan lityum tedavisinin düşük dozda (2 mmol/kg) nörolojik fonksiyon bozukluklarını iyileştirdiği, oluşan iskemik hasar ve ödemi azalttığı, bozulan KBB bütünlüğünü restore ettiği, iskemik striatumda apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve nöronal sağkalımı arttırdığı görülmüştür. Nöronal sağkalım kinazı olan Akt ve ERK1/2'nin fosforilasyonlarını arttığı, bu proteinlerin inhibe edildiği iskemi koşullarında ise nöronal sağkalım etkisinin Akt'de kaybolduğu ERK'da devam ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar ile lityumun serebral iskemi sonrası gösterdiği nöroprotektif etkinin sinyal iletim mekanizmasının PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir.

Bu tez kapsamında lityumun beyin felci hasarında etki ettiği sinyal iletim mekanizmalarının aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu tezde görülen sonuçlar ile beyin felci sonrasında farmakolojik tedavi bazlı lityum ve benzeri bileşiklerin kullanım potansiyeline ve hedef moleküllerinin belirlenmesine katkı sağlandığı düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Soler, E.P. and V.C. Ruiz, Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Curr Cardiol Rev*, 2010. **6**(3): p. 138-49.
2. Roth, J.M., Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2011. **24**(3): p. 257-9.
3. Beker, M.Ç., Melatonin ve normobarik oksijen tedavi kombinasyonunun beyin felci sonrası nöroprotektif rolü. 2018.
4. Chatauret, N., et al., Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol*, 2014. **24 Suppl 1**: p. S4-12.
5. Guo, C., et al., Protocatechualdehyde Protects Against Cerebral Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Injury Via Protein Kinase Cepsilon/Nrf2/HO-1 Pathway. *Mol Neurobiol*, 2017. **54**(2): p. 833-845.
6. Yaidikar, L. and S. Thakur, Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3. *Mol Cell Biochem*, 2015. **402**(1-2): p. 141-8.
7. Zhang, S., et al., Antioxidant and anti-excitotoxicity effect of Gualou Guizhi decoction on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*, 2015. **9**(6): p. 2121-2126.
8. Machado-Vieira, R., et al., Lithium efficacy in bipolar depression with flexible dosing: A six-week, open-label, proof-of-concept study. *Exp Ther Med*, 2014. **8**(4): p. 1205-1208.
9. Jia, J.M., et al., Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles. *Nat Methods*, 2017. **14**(2): p. 160-166.
10. Liu, T.T., L.W. Clark, and C. Chin, Exotic domain walls in Bose-Einstein condensates with double-well dispersion. *Physical Review A*, 2016. **94**(6).
11. Semple, P.F., Difficult hypertension: practical management and decision making. *BMJ*, 1995. **311**(6998): p. 205.
12. van Asch, C.J., et al., Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(2): p. 167-76.
13. Caceres, J.A. and J.N. Goldstein, Intracranial hemorrhage. *Emerg Med Clin North Am*, 2012. **30**(3): p. 771-94.
14. Grysiewicz, R.A., K. Thomas, and D.K. Pandey, Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin*, 2008. **26**(4): p. 871-95, vii.
15. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 1999. **22**(9): p. 391-7.
16. Ovbiagele, B. and M.N. Nguyen-Huynh, Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics*, 2011. **8**(3): p. 319-29.
17. Gautier, J.C. and P. Pullicino, A clinical approach to cerebrovascular disease. *Neuroradiology*, 1985. **27**(6): p. 452-9.
18. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1391-401.

19. Turley, K.R., L.H. Toledo-Pereyra, and R.U. Kothari, Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke. *J Invest Surg*, 2005. **18**(4): p. 207-18.
20. Tobin, M.K., et al., Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014. **34**(10): p. 1573-84.
21. Aaij, R., et al., Determination of f(s)/f(d) for 7 TeV pp collisions and measurement of the B⁰→D-K⁺ branching fraction. *Phys Rev Lett*, 2011. **107**(21): p. 211801.
22. Nour, M., F. Scalzo, and D.S. Liebeskind, Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interventional neurology*, 2012. **1**(3-4): p. 185-199.
23. Bolanos, J.P. and A. Almeida, Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1411**(2-3): p. 415-36.
24. Kietadisorn, R., R.P. Juni, and A.L. Moens, Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(5): p. E481-95.
25. Li, J., H. Zhang, and C. Zhang, Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(4): p. 865-72.
26. Olmez, I. and H. Ozyurt, Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int*, 2012. **60**(2): p. 208-12.
27. Peters, O., et al., Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998. **18**(2): p. 196-205.
28. Rodriguez, F., et al., Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(15): p. 2776-94.
29. Shen, J., et al., Nitric oxide and oxygen radicals induced apoptosis via bcl-2 and p53 pathway in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Sci China C Life Sci*, 2003. **46**(1): p. 28-39.
30. Vitturi, D.A. and R.P. Patel, Current perspectives and challenges in understanding the role of nitrite as an integral player in nitric oxide biology and therapy. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(4): p. 805-12.
31. Kumar, A. and D.J. Loane, Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(8): p. 1191-201.
32. Xanthos, D.N. and J. Sandkuhler, Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*, 2014. **15**(1): p. 43-53.
33. Chodobski, A., B.J. Zink, and J. Szmydynger-Chodobska, Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res*, 2011. **2**(4): p. 492-516.
34. Hernandez-Ontiveros, D.G., et al., Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol*, 2013. **4**: p. 30.
35. Schmidt, O.I., et al., Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. **48**(2): p. 388-99.
36. Biesmans, S., et al., Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 271359.

37. Erickson, M.A. and W.A. Banks, Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(8): p. 1637-48.
38. Kabadi, S.V. and A.I. Faden, Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(1): p. 1216-36.
39. Park, S.M., et al., Ginsenoside Rg3 attenuates microglia activation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice. *Biol Pharm Bull*, 2012. **35**(9): p. 1546-52.
40. Qin, L., et al., Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 2007. **55**(5): p. 453-62.
41. Tremblay, M.E., The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol*, 2011. **7**(1): p. 67-76.
42. Fricker, M., et al., Neuronal Cell Death. *Physiol Rev*, 2018. **98**(2): p. 813-880.
43. Rama, R. and J.C. García, Excitotoxicity and oxidative stress in acute stroke. *Ischemic Stroke Updates*, 2016.
44. Radak, D., et al., Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017. **15**(2): p. 115-122.
45. Onteniente, B., et al., The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspase therapy. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(8): p. 1643-9.
46. Khoshnam, S.E., et al., Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*, 2017. **38**(7): p. 1167-1186.
47. Liu, X., et al., Shengmai injection reduces apoptosis and enhances angiogenesis after myocardial ischaemia and reperfusion injury in rats. *Biomed Pharmacother*, 2018. **104**: p. 629-636.
48. Ma, D., et al., Protective Effects of Cornel Iridoid Glycoside in Rats After Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*, 2018. **43**(4): p. 959-971.
49. Sezen, S.C., et al., Assessment of the effects of levosimendan and thymoquinone on lung injury after myocardial ischemia reperfusion in rats. *Drug Des Devel Ther*, 2018. **12**: p. 1347-1352.
50. Xue, R., et al., Mitofusin2 Induces Cell Autophagy of Pancreatic Cancer through Inhibiting the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 2798070.
51. Gupta, S., Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*, 2003. **22**(1): p. 15-20.
52. Uzdensky, A.B., Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, 2019. **24**(9-10): p. 687-702.
53. Berezki, D., [Pharmacotherapy of stroke]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 2009. **11**(1): p. 7-13.
54. Chen, C.H., et al., Chloroacetic acid induced neuronal cells death through oxidative stress-mediated p38-MAPK activation pathway regulated mitochondria-dependent apoptotic signals. *Toxicology*, 2013. **303**: p. 72-82.
55. Lu, T.H., et al., Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. *Toxicol Lett*, 2014. **224**(1): p. 130-40.

56. Wang, Q.Y., et al., [Effects of ginsenoside Rg1 on the expressions of p-eRK1/2 and p-JNK in local cerebral ischemia/reperfusion injury rats]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2013. **33**(2): p. 229-34.
57. Iadecola, C. and J. Anrather, The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 2011. **17**(7): p. 796-808.
58. Kawabori, M. and M.A. Yenari, Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(10): p. 1258-77.
59. Jassam, Y.N., et al., Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*, 2017. **95**(6): p. 1246-1265.
60. Malone, K., et al., The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol Cell Biol*, 2019. **97**(1): p. 5-16.
61. Jin, R., G. Yang, and G. Li, Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, 2010. **87**(5): p. 779-89.
62. Anthony, D.C., K. Walker, and V.H. Perry, The therapeutic potential of CXC chemokine blockade in acute inflammation in the brain. *Expert Opin Investig Drugs*, 1999. **8**(4): p. 363-71.
63. Banati, R.B., et al., Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 1993. **7**(1): p. 111-8.
64. Hughes, P.M., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002. **22**(3): p. 308-17.
65. Rothwell, N.J., S.A. Loddick, and P. Stroemer, Interleukins and cerebral ischaemia. *Int Rev Neurobiol*, 1997. **40**: p. 281-98.
66. Schnell, L., et al., Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999. **58**(3): p. 245-54.
67. Widmann, C., et al., The Traditional Chinese Medicine MLC901 inhibits inflammation processes after focal cerebral ischemia. *Scientific Reports*, 2018. **8**.
68. Cekanaviciute, E. and M.S. Buckwalter, Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, 2016. **13**(4): p. 685-701.
69. Allen, C.L. and U. Bayraktutan, Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*, 2009. **4**(6): p. 461-70.
70. Bergendi, L., et al., Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 1999. **65**(18-19): p. 1865-74.
71. Kalogeris, T., Y. Bao, and R.J. Korthuis, Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 702-14.
72. Sugawara, T., et al., Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci*, 2002. **22**(1): p. 209-17.
73. Kudin, A.P., et al., The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1817**(10): p. 1901-6.
74. Wu, L., et al., Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Mol Neurosci*, 2020. **13**: p. 28.
75. Wu, M.Y., et al., Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.

76. Lazarou, M., et al., The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 2015. **524**(7565): p. 309-314.
77. Liu, F., et al., Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging Dis*, 2018. **9**(5): p. 924-937.
78. Pinky, N.F., et al., Region- and Activity-Dependent Regulation of Extracellular Glutamate. *J Neurosci*, 2018. **38**(23): p. 5351-5366.
79. Marmiroli, P. and G. Cavaletti, The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. *Curr Med Chem*, 2012. **19**(9): p. 1269-76.
80. Angulo, M.C., et al., Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci*, 2004. **24**(31): p. 6920-7.
81. Mark, L.P., et al., Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2001. **22**(10): p. 1813-24.
82. Rowley, N.M., et al., Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*, 2012. **61**(4): p. 546-58.
83. Diaz-Ruiz, A., et al., Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance image after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Brain Res*, 2016. **1646**: p. 384-392.
84. Bylicky, M.A., G.P. Mueller, and R.M. Day, Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 6501031.
85. Volterra, A., D. Trotti, and G. Racagni, Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol*, 1994. **46**(5): p. 986-92.
86. Milewski, K., et al., TNFalpha increases STAT3-mediated expression of glutaminase isoform KGA in cultured rat astrocytes. *Cytokine*, 2019. **123**: p. 154774.
87. Erecinska, M. and I.A. Silver, Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*, 2001. **128**(3): p. 263-76.
88. Doyle, K.P., R.P. Simon, and M.P. Stenzel-Poore, Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 2008. **55**(3): p. 310-8.
89. Luoma, J.I., B.G. Kelley, and P.G. Mermelstein, Progesterone inhibition of voltage-gated calcium channels is a potential neuroprotective mechanism against excitotoxicity. *Steroids*, 2011. **76**(9): p. 845-55.
90. Papazian, I., et al., Mesenchymal Stem Cell Protection of Neurons against Glutamate Excitotoxicity Involves Reduction of NMDA-Triggered Calcium Responses and Surface GluR1, and Is Partly Mediated by TNF. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(3).
91. Mori, T., et al., Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. *Neurochem Int*, 2004. **45**(2-3): p. 381-7.
92. Sattler, R., et al., Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 1999. **284**(5421): p. 1845-8.
93. Rebai, O. and M. Amri, Chlorogenic Acid Prevents AMPA-Mediated Excitotoxicity in Optic Nerve Oligodendrocytes Through a PKC and Caspase-Dependent Pathways. *Neurotox Res*, 2018. **34**(3): p. 559-573.

94. Hossmann, K.A., Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1996. **8**(3): p. 195-208.
95. Hartings, J.A., et al., The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leao's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017. **37**(5): p. 1571-1594.
96. Rakers, C. and G.C. Petzold, Astrocytic calcium release mediates peri-infarct depolarizations in a rodent stroke model. *J Clin Invest*, 2017. **127**(2): p. 511-516.
97. Vacheron-Trystram, M.N., et al., [Antipsychotics in bipolar disorders]. *Encephale*, 2004. **30**(5): p. 417-24.
98. Burgess, S., et al., Lithium for maintenance treatment of mood disorders. *Cochrane Database Syst Rev*, 2001(2): p. CD003013.
99. Dunner, D.L., Drug interactions of lithium and other antimanic/mood-stabilizing medications. *J Clin Psychiatry*, 2003. **64 Suppl 5**: p. 38-43.
100. Young, W., Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplant*, 2009. **18**(9): p. 951-75.
101. Schou, M., et al., The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1954. **17**(4): p. 250-60.
102. Altamura, A.C., et al., Mood stabilizers for patients with bipolar disorder: the state of the art. *Expert Rev Neurother*, 2011. **11**(1): p. 85-99.
103. Manji, H.K., G.J. Moore, and G. Chen, Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J Clin Psychiatry*, 2000. **61 Suppl 9**: p. 82-96.
104. Wada, A., et al., Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci*, 2005. **99**(4): p. 307-21.
105. Bian, Q., et al., Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res*, 2007. **1184**: p. 270-6.
106. Li, H., et al., Lithium-mediated long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxia-ischemia is associated with antiinflammatory effects and enhanced proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011. **31**(10): p. 2106-15.
107. Nonaka, S. and D.M. Chuang, Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport*, 1998. **9**(9): p. 2081-4.
108. Sasaki, T., et al., Lithium-induced activation of Akt and CaM kinase II contributes to its neuroprotective action in a rat microsphere embolism model. *Brain Res*, 2006. **1108**(1): p. 98-106.
109. Xu, J., et al., Chronic treatment with a low dose of lithium protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*, 2003. **34**(5): p. 1287-92.
110. Yan, X.B., et al., Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. *Behav Brain Res*, 2007. **177**(2): p. 282-9.
111. Ren, M., et al., Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(10): p. 6210-5.
112. Mason, R.W., et al., Pharmacokinetics of lithium: elimination half-time, renal clearance and apparent volume of distribution in schizophrenia. *Clin Pharmacokinet*, 1978. **3**(3): p. 241-6.

113. Ehrlich, B.E., C. Clausen, and J.M. Diamond, Lithium pharmacokinetics: single-dose experiments and analysis using a physiological model. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1980. **8**(5): p. 439-61.
114. McKnight, R.F., et al., Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2012. **379**(9817): p. 721-8.
115. Amdisen, A., Serum level monitoring and clinical pharmacokinetics of lithium. *Clin Pharmacokinet*, 1977. **2**(2): p. 73-92.
116. Couffignal, C., et al., The pharmacokinetics of lithium, in *The Science and Practice of Lithium Therapy*. 2017, Springer. p. 25-53.
117. Sproule, B.A., B.G. Hardy, and K.I. Shulman, Differential pharmacokinetics of lithium in elderly patients. *Drugs Aging*, 2000. **16**(3): p. 165-77.
118. Hewick, D.S., et al., Age as a factor affecting lithium therapy. *British journal of clinical pharmacology*, 1977. **4**(2): p. 201-205.
119. Bauer, M., P. Grof, and B. Muller-Oerlinghausen, *Lithium in neuropsychiatry: the comprehensive guide*. 2013: CRC Press.
120. Terhaag, B., et al., The distribution of lithium into cerebrospinal fluid, brain tissue and bile in man. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*, 1978. **16**(7): p. 333-5.
121. Hayslett, J.P. and M. Kashgarian, A micropuncture study of the renal handling of lithium. *Pflugers Arch*, 1979. **380**(2): p. 159-63.
122. Thomsen, K. and D.G. Shirley, A hypothesis linking sodium and lithium reabsorption in the distal nephron. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(4): p. 869-80.
123. Trepiccione, F. and B.M. Christensen, Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: new clinical and experimental findings. *J Nephrol*, 2010. **23 Suppl 16**: p. S43-8.
124. Arancibia, A., et al., Absorption and disposition kinetics of lithium carbonate following administration of conventional and controlled release formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1986. **24**(5): p. 240-5.
125. Cooper, T.B., et al., Evaluation of a slow-release lithium carbonate formulation. *Am J Psychiatry*, 1978. **135**(8): p. 917-22.
126. Granneman, G.R., et al., Pharmacokinetic interactions and side effects resulting from concomitant administration of lithium and divalproex sodium. *J Clin Psychiatry*, 1996. **57**(5): p. 204-6.
127. Hunter, R., Steady-state pharmacokinetics of lithium carbonate in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 1988. **25**(3): p. 375-80.
128. Lee, C.F., Y.Y. Yang, and O.Y. Hu, Single dose pharmacokinetic study of lithium in Taiwanese/Chinese bipolar patients. *Aust N Z J Psychiatry*, 1998. **32**(1): p. 133-6.
129. Luisier, P.A., P. Schulz, and P. Dick, The pharmacokinetics of lithium in normal humans: expected and unexpected observations in view of basic kinetic principles. *Pharmacopsychiatry*, 1987. **20**(5): p. 232-4.
130. Thornhill, D.P., Pharmacokinetics of ordinary and sustained-release lithium carbonate in manic patients after acute dosage. *Eur J Clin Pharmacol*, 1978. **14**(4): p. 267-71.
131. Olesen, V., M. Schou, and K. Thomsen, Administration of lithium to rats by different routes. *Neuropsychobiology*, 1976. **2**(2-3): p. 134-138.

132. Wood, A., et al., The pharmacokinetic profile of lithium in rat and mouse; an important factor in psychopharmacological investigation of the drug. *Neuropharmacology*, 1986. **25**(11): p. 1285-1288.
133. Wraae, O., The pharmacokinetics of lithium in the brain, cerebrospinal fluid and serum of the rat. *British journal of pharmacology*, 1978. **64**(2): p. 273-279.
134. Soares, J.C., et al., Brain lithium concentrations in bipolar disorder patients: preliminary ⁷Li magnetic resonance studies at 3 T. *Biol Psychiatry*, 2001. **49**(5): p. 437-43.
135. Grandjean, E.M. and J.M. Aubry, Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety. *CNS Drugs*, 2009. **23**(5): p. 397-418.
136. Kato, T., T. Inubushi, and S. Takahashi, Relationship of lithium concentrations in the brain measured by lithium-7 magnetic resonance spectroscopy to treatment response in mania. *J Clin Psychopharmacol*, 1994. **14**(5): p. 330-5.
137. Komoroski, R.A., Biomedical applications of ⁷Li NMR. *NMR Biomed*, 2005. **18**(2): p. 67-73.
138. Riedl, U., et al., Duration of lithium treatment and brain lithium concentration in patients with unipolar and schizoaffective disorder--a study with magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry*, 1997. **41**(8): p. 844-50.
139. Sachs, G.S., et al., Variability of brain lithium levels during maintenance treatment: a magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry*, 1995. **38**(7): p. 422-8.
140. Hillert, M., M. Zimmermann, and J. Klein, Uptake of lithium into rat brain after acute and chronic administration. *Neurosci Lett*, 2012. **521**(1): p. 62-6.
141. Komoroski, R.A., et al., In vivo NMR spectroscopy of lithium-7 in humans. *Magn Reson Med*, 1990. **15**(3): p. 347-56.
142. Renshaw, P.F., et al., Relaxation and imaging of lithium in vivo. *Magn Reson Imaging*, 1986. **4**(3): p. 193-8.
143. Girard, F., et al., ⁷Li 2D CSI of human brain on a clinical scanner. *MAGMA*, 2001. **13**(1): p. 1-7.
144. Kato, T., et al., Alterations in brain phosphorous metabolism in bipolar disorder detected by in vivo ³¹P and ⁷Li magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*, 1993. **27**(1): p. 53-9.
145. Francis, R.I. and M.A. Traill, Lithium distribution in the brains of two manic patients. *Lancet*, 1970. **2**(7671): p. 523-4.
146. Spirtes, M.A., Lithium levels in monkey and human brain after chronic, therapeutic, oral dosage. *Pharmacol Biochem Behav*, 1976. **5**(2): p. 143-7.
147. Wittrig, J., E.J. Anthony, and H.E. Lucarno, An ashing technique for endogenous lithium in human brain and other biological tissues. *Dis Nerv Syst*, 1970. **31**(6): p. 408-11.
148. Ebadi, M.S., et al., Pharmacokinetics of lithium and its regional distribution in rat brain. *Eur J Pharmacol*, 1974. **27**(3): p. 324-9.
149. Edelfors, S., Distribution of sodium, potassium and lithium in the brain of lithium-treated rats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1975. **37**(5): p. 387-92.
150. Mukherjee, B.P., P.T. Bailey, and S.N. Pradhan, Temporal and regional differences in brain concentrations of lithium in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1976. **48**(1): p. 119-21.

151. Nelson, S.C., et al., Localization and quantitation of lithium in rat tissue following intraperitoneal injections of lithium chloride. II. Brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980. **212**(1): p. 11-5.
152. Wada, M., A. Shimada, and T. Fujita, Functional characterization of Na⁺ - coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Brain Res*, 2006. **1081**(1): p. 92-100.
153. Rybakowski, J.K., Genetic influences on response to mood stabilizers in bipolar disorder: current status of knowledge. *CNS Drugs*, 2013. **27**(3): p. 165-73.
154. Çağlayan, A.B., CDNF ve manf nörotrofik faktörlerinin iskemi sonrası beyin plastisitesi ve onarımı üzerine olan etkileri. 2017.
155. Beker, M.C., et al., Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget*, 2015. **6**(31): p. 30604.
156. Kilic, E., et al., HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 422.
157. Doeppner, T.R., et al., Lithium-induced neuroprotection in stroke involves increased miR-124 expression, reduced RE1-silencing transcription factor abundance and decreased protein deubiquitination by GSK3beta inhibition-independent pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017. **37**(3): p. 914-926.
158. Caglayan, B., et al., Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*, 2017. **296**: p. 23-31.
159. Beker, M.C., et al., Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget*, 2015. **6**(31): p. 30604-14.
160. Dostovic, Z., et al., Brain Edema After Ischaemic Stroke. *Med Arch*, 2016. **70**(5): p. 339-341.
161. Grieb, P., et al., O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol* (1985), 1985. **58**(6): p. 1929-41.
162. Krueger, M., et al., Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56419.
163. Ramos, E., et al., Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med*, 2017. **104**: p. 32-53.
164. Pardridge, W.M., J. Eisenberg, and J. Yang, Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem*, 1985. **44**(6): p. 1771-8.
165. Zhang, Y. and W.M. Pardridge, Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 2001. **76**(5): p. 1597-600.
166. Lu, T.H., et al., Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicol Lett*, 2011. **204**(1): p. 71-80.
167. Pietri, M., et al., Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 28470-9.

168. Xu, K., N. Tavernarakis, and M. Driscoll, Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Neuron*, 2001. **31**(6): p. 957-971.
169. Lai, T.W., S. Zhang, and Y.T. Wang, Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology*, 2014. **115**: p. 157-188.
170. Benveniste, H., et al., Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*, 1984. **43**(5): p. 1369-74.
171. Drejer, J., et al., Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem*, 1985. **45**(1): p. 145-51.
172. Hagberg, H., et al., Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1985. **5**(3): p. 413-9.
173. Silverstein, F.S., K. Buchanan, and M.V. Johnston, Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity [³H]glutamate uptake into synaptosomes. *J Neurochem*, 1986. **47**(5): p. 1614-9.
174. Dawson, L.A., et al., Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull*, 2000. **53**(6): p. 767-76.
175. Bosley, T., et al., Effects of anoxia on the stimulated release of amino acid neurotransmitters in the cerebellum in vitro. *Journal of neurochemistry*, 1983. **40**(1): p. 189-201.
176. Berdichevsky, E., et al., Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci Lett*, 1983. **36**(1): p. 75-80.
177. Jancso, G., et al., Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res*, 1984. **295**(2): p. 211-6.
178. Bisset, K.A., Demonstration of the initial cell in *Streptomyces griseus* by a new microscopic technique. *J Gen Microbiol*, 1978. **104**(1): p. 157-9.
179. Schielke, G.P., et al., Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998. **18**(2): p. 180-5.
180. Mrschtik, M. and K.M. Ryan, Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *FEBS J*, 2015. **282**(10): p. 1858-70.
181. Yamashima, T., Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell calcium*, 2004. **36**(3-4): p. 285-293.
182. Manning, B.D., et al., Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 151-62.
183. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(1): p. 59-71.
184. Brazil, D.P., Z.Z. Yang, and B.A. Hemmings, Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(5): p. 233-42.
185. Colucci-D'Amato, L., C. Perrone-Capano, and U. di Porzio, Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays*, 2003. **25**(11): p. 1085-95.

186. Alessi, D.R., et al., Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
187. Alessi, D.R., et al., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 1997. **7**(4): p. 261-9.
188. Fayard, E., et al., Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 24): p. 5675-8.
189. Wymann, M.P., M. Zvelebil, and M. Laffargue, Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci*, 2003. **24**(7): p. 366-76.
190. Bayascas, J.R. and D.R. Alessi, Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell*, 2005. **18**(2): p. 143-5.
191. Stephens, L., et al., Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 1998. **279**(5351): p. 710-4.
192. Hernandez, F., et al., GSK3 inhibitors and disease. *Mini Rev Med Chem*, 2009. **9**(9): p. 1024-9.
193. Forlenza, O.V., et al., Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*, 2011. **45**(2): p. 220-4.
194. Campos-Gonzalez, R. and M.S. Kindy, Tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase after transient ischemia in the gerbil brain. *J Neurochem*, 1992. **59**(5): p. 1955-8.
195. Hu, B.R. and T. Wieloch, Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem*, 1994. **62**(4): p. 1357-67.
196. Segal, R.A. and M.E. Greenberg, Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 1996. **19**: p. 463-89.
197. Yao, H., et al., The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 8240-7.
198. Grewal, S.S., R.D. York, and P.J. Stork, Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 1999. **9**(5): p. 544-53.
199. Shamloo, M., A. Rytter, and T. Wieloch, Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience*, 1999. **93**(1): p. 81-8.
200. Atkins, C.M., et al., The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci*, 1998. **1**(7): p. 602-9.
201. Berman, D.E., et al., Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci*, 1998. **18**(23): p. 10037-44.
202. Blum, S., et al., A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J Neurosci*, 1999. **19**(9): p. 3535-44.
203. Schaeffer, H.J. and M.J. Weber, Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 2435-44.

204. Cavanaugh, J.E., Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(11): p. 2056-9.
205. Wang, R.M., et al., Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 2005. **80**(3): p. 391-9.
206. Sturla, L.M., et al., A novel role for extracellular signal-regulated kinase 5 and myocyte enhancer factor 2 in medulloblastoma cell death. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5683-9.
207. Nishimoto, S. and E. Nishida, MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep*, 2006. **7**(8): p. 782-6.
208. Subramaniam, S. and K. Unsicker, ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J*, 2010. **277**(1): p. 22-9.
209. Chuang, D.M., et al., Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*, 2002. **4**(2): p. 129-36.
210. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, 2018. **25**(1): p. 65-80.
211. Rosell, A. and E.H. Lo, Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol*, 2008. **8**(1): p. 82-9.
212. Rosenberg, G.A., et al., Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996. **16**(3): p. 360-6.
213. Park, K.P., et al., Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2009. **40**(8): p. 2836-42.
214. Love, S., Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*, 1999. **9**(1): p. 119-31.
215. Volpe, M. and F. Cosentino, Abnormalities of endothelial function in the pathogenesis of stroke: the importance of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. **35**(4 Suppl 2): p. S45-48.
216. Wang, Z.F., E.B. Fessler, and D.M. Chuang, Beneficial effects of mood stabilizers lithium, valproate and lamotrigine in experimental stroke models. *Acta Pharmacol Sin*, 2011. **32**(12): p. 1433-45.
217. Kapinya, K.J., K. Prass, and U. Dirnagl, Isoflurane induced prolonged protection against cerebral ischemia in mice: a redox sensitive mechanism? *Neuroreport*, 2002. **13**(11): p. 1431-5.
218. Bellacosa, A., et al., Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, 1998. **17**(3): p. 313-25.
219. Zhao, H., et al., Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*, 2005. **25**(42): p. 9794-806.
220. Kilic, E., et al., The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J*, 2006. **20**(8): p. 1185-7.
221. Jin, G., et al., Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals. *Neurol Res*, 2003. **25**(3): p. 249-53.
222. Saito, A., et al., Oxidative stress affects the integrin-linked kinase signaling pathway after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2004. **35**(11): p. 2560-5.
223. Liu, P., et al., Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 2009. **8**(8): p. 627-644.

224. XU, Shenbin, et al. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 294.



10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/05/2019	28		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Beyin felci sonrası lityumun etkisinde sinyal iletim yollarının rolü” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01/06/2019-6 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-38828770-772.02-3127
Konu: Etik Kurulu Kararı

01/07/2021

Sayın Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 17/05/2019 tarihli 28 karar no ile onay verilen "Beyin felci sonrası lityumun etkisinde sinyal iletim yollarının rolü" isimli çalışmanızın başlığını "Lityumun Nöroprotektif Etkisi ve Bu Etkide Hücre İçi Sinyal İletim Yollarının Rollerinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 37833240X6 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi için: Bilge KAYA
Tel: 0212 531 75 55 E-posta: kgayab@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA

DEĞİŞİKLİK DİLEKÇESİ FORMU

Adı, Soyadı : Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Programı : Tıbbi Farmakoloji Doktora Programı

Etik Kurul Aldığı Tarihi: 17/05/2019

Etik Kurul Karar No: 28

Araştırma İsminin Açık Adı: Beyin felci sonrası lityumun etkisinde sinyal iletim yollarının rolü

Değişiklik Gerekçesi : Etik kurul başlığımın doktora tez projemle aynı olması şartından dolayı “Beyin felci sonrası lityumun etkisinde sinyal iletim yollarının rolü” olan başlığımı “Lityumun nöroprotektif etkisi ve bu etkide hücre içi sinyal iletim yollarının rollerinin incelenmesi” başlığıyla değiştirmek istiyorum