



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİYET RESTRİKSİYONU İLE ÖN KOŞULLANDIRMA
TEKNİĞİNİN FARE BEYİN FELCİ MODELİNDEKİ
NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

SERDAR ALTUNAY

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2017

İTHAF



*“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

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

Tezin başlamasından sonuna kadar yanımda olan, desteğini, arkadaşlığını, samimiyetini esirgemeyen Arman DALAY'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, bu tez sürecinde desteklerini esirgemeyen, değerli laboratuvar ekibime; A. Burak ÇAĞLAYAN, M. Çağlar BEKER, Taha KELEŞTEMUR, Berrak ÇAĞLAYAN, Esra YALÇIN, Aysun DİLDEN, Elif SERTEL, Zeynep BALÇIKANLI, Emre TANCAN, Reyda KARAÇAY ve dostum Semih DURMUŞ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

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

Desteklerini her daim yanımda hissettiğim, değerli dostlarım Zikri DÜNDAR, Orhan EREN ve Volkan DEMİR'e minnettarlığımı sunuyorum

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

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	I
BEYAN	II
İTHAF	III
TEŞEKKÜR	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	VII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VIII
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. İskemik Beyin Felcinin Patofizyolojisi	4
4.1.1 Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite	5
4.1.2 Oksidatif stres	5
4.1.3 Enflamasyon	6
4.1.4 Hücre ölüm çeşitleri; apoptoz, nekroz ve otofaji	7
4.1.4.1. Apoptoz	7
4.1.4.2. Nekroz	7
4.1.4.3. Otofaji	8
4.2. Beyin Felcinde Muhtemel Klinik Tedaviler ve Tedavide Karşılaşılan Zorluklar	9
4.3. Diyet Kısıtlaması	10
4.4. Diyet Kısıtlaması ve İskemi	13
5. MATERYAL VE METOT	15
5.1. Deney Dizaynı	15
5.2. Beslenme	16
5.3. Beyin Felci Metodu	17

5.4. Nörolojik Hasar Skorlaması	18
5.5. İmmünohistokimya ve İmmünofloresan Boyamaları	19
5.5.1. Cresyl violet boyaması, hasar alanı ve beyin ödemi hesaplanması	19
5.5.2. DNA fragmantasyon analizi	19
5.5.3. Nöronal sağkalım analizi	20
5.6. İstatistik	20
6. BULGULAR	21
6.1. Lazer Doppler Flowmetri	21
6.2. Diyete Bağlı Kilo Oranlarının Takibi	22
6.3. Nörolojik Hasar Skorlaması	24
6.4. Hasar Hacmi	25
6.5. Beyin Ödemi	26
6.6. Nöronal Sağkalım	27
6.7. DNA Fragmantasyonu	28
7. TARTIŞMA	29
8. SONUÇ	34
9. KAYNAKLAR	35
10. ETİK KURUL ONAYI	53
11. ÖZGEÇMİŞ	54

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenozin trifosfat
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
COX	Siklooksijenaz
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribo nükleik asit
HDM	Hücre dışı matris
ICAM-1	Hücre içi adezyon molekülü
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KBB	Kan beyin bariyeri
LDF	Lazer Doppler flowmetri
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGS	Normal keçi serumu
NMDA	N-metil-D-aspartat
OSAT	Orta Serebral Arter Tıkanması
PBS	Fosfat tamponlu salin
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tümör nekroz faktörü
T-PA	Doku plazminojen aktivatörü
TUNEL	Terminal transferase biotinylated-dUTP nick end labeling

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 5.1.1. Deney dizaynı	16
Şekil 5.3.1. Orta serebral arter tıkanması metodu	18
Şekil 6.1.1. 30 dakika iskemi seti için orta serebral arter bölgesinden alınan Lazer Doppler kan akımı (LDF) kaydı.	21
Şekil 6.1.2. 90 dakika iskemi seti için orta serebral arter bölgesinden alınan Lazer Doppler kan akımı (LDF) kaydı.	22
Şekil 6.2.1. 30 dk OSA tıkanması deney seti kilo takibi.....	23
Şekil 6.2.2. 90 dk OSA tıkanması deney seti kilo takibi.....	23
Şekil 6.3.1. Nörolojik hasar skorlaması.	24
Şekil 6.4.1. 90 dakika iskemi sonrası hasar hacminin cresyl violet boyaması yapılarak değerlendirilmesi.	25
Şekil 6.5.1. 90 dakika iskemi sonrası ödem hacminin cresyl violet boyaması yapılarak değerlendirilmesi.	26
Şekil 6.6.1. Nöronal sağkalımın değerlendirilmesi	27
Şekil 6.7.1. Apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi.	28

1. ÖZET

DIYET RESTRIKSİYONU İLE ÖN KOŞULLANDIRMA TEKNİĞİNİN FARE BEYİN FELCİ MODELİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sağlığımızın devamlılığını korumak için önemli bir olgu olan beslenme, aynı zamanda sağlık için tehdit de oluşturabilmektedir. Beslenmedeki bozukluklar sonucu, çeşitli hastalıklara yakalanma riskleri arttığı gibi varolan patofizyolojik süreçler de etkilenebilmektedir. Bu hastalıklardan biri de günümüzde dünya ölüm sıralamalarında ilk üçte yer alan beyin felcidir. Bu çalışmada, kısa dönemli diyet kısıtlamasının fare beyin felci modelindeki, hasar alanı, ödem, nöronal sağkalım ve apoptotik hücre ölümüne olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada etik kurulu alınmış (karar no:35/2017), 90 ve 30 dakikalık (sırasıyla 24 ve 72 saat reperfüzyon) orta serebral arter tıkanması modeli uygulanan 8-12 haftalık erkek BALB/c fareler kullanılmıştır. Fareler operasyondan üç gün önce gruplarına göre hazırlanmış %70 yoğunluktaki (n=7; protein, yağ, karbonhidrat) diyetlerle beslenmişlerdir. Kontrol grubu standart yemle beslenmeye devam ederken, açlık grubunun yemleri çekilerek sadece suya erişimine izin verilmiştir. İstatistik olarak one-way ANOVA yöntemi kullanılmıştır. Yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda, 90 ve 30 dakika iskemideki Laser Doppler flowmetri kayıtlarında, kontrol ve diğer gruplara göre hipoperfüzyon gözlenmiştir. Buna ilaveten 90 dakika iskemide yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla beyindeki hasarın ve ödemin anlamlı olarak artmış olduğu görüldü. Hücresel sağkalıma bakıldığında, yüksek yağ ve yüksek karbonhidrat gruplarında kontrol grubuna kıyasla canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma izlenmiştir. Bu çalışmada diyet restriksiyonunun fare beyin felci modelindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda beslenmenin beyin felci süreçlerini etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyet Restriksiyonu, Önkoşullandırma, Serebral İskemi

2. ABSTRACT

THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF DIET RESTRICTION PRECONDITIONING ON CEREBRAL ISCHEMIA MODEL ON MICE

Nutrition is an important factor in order to maintain our healthy state. However, it can also become a major threat in the cases of malnutrition. Malnutrition affects several pathophysiological processes and also increases susceptibility to a number of diseases. Cerebral ischemia is an example for such diseases and is the third main reason of mortality worldwide. In this study, we examined the effects of short-term diet restriction using a cerebral ischemia model in mice in terms of infarct volume, edema formation, neuronal survival and apoptotic cell death. This study was carried out in 8-12 weeks old BALB/c mice; with the permission from the Medipol University Ethical board (#35/2017). 90 and 30 minutes (followed by 24 and 72 hours of reperfusion, respectively) of middle cerebral artery occlusion were performed. Animals were fed with %70 high density diets (n=7, protein, fat or carbohydrate) three days prior to middle cerebral artery occlusion. The fasting group was given ad libitum access to water only, whereas the control group was fed on standard mice food. The animals that had high-fat diets showed hypoperfusion on the Laser Doppler flowmeter records on both 90 and 30 minutes of middle cerebral artery occlusion when compared with control and the other diet groups. Also, within the same group, the mice that had gone under 90 minutes of occlusion period had increased edema and infarct volume compared with the control group. Furthermore, the decrease in the neuronal survival rates of the high fat and high carbohydrate groups was statistically significant when compared with the control group. This study focuses on the effects of diet restriction on the recovery processes including neuronal survival and apoptotic cell death following cerebral ischemic injury in mice. Our results suggest that nutrition results in differential effects on the recovery processes, and therefore further studies should be conducted to identify the underlying mechanisms of the beneficial effects of dieting.

Keywords: Cerebral Ischemia, Diet Restriction, Preconditioning

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre serebrovaskular hastalıklar son 15 yıl içerisinde dünyada meydana gelen ölüm sıralamalarında ikinci sırada yer almaktadır. Ortaya çıkan beyin felci vakalarının ~%87'si beyin damarlarının tıkanması sonucu gerçekleşmektedir. İskemik beyin felci, beyni besleyen ana damarın geçici ya da kalıcı olarak tıkanması sonucu, serebral kan akımının %20'nin altına düşmesiyle karakterizedir. Kan akımındaki bu düşüş çoğunlukla serebral arterlerin, tromboz ya da emboliyle tıkanması nedeniyle olmaktadır (1). Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre her 40 saniyede bir kişi beyin felci geçirmektedir. Buna ek olarak, yapılan araştırmalarda, 2014 verilerine göre ortalama her 4 dakikada bir kişi beyin felci nedeniyle ölmektedir (2) ve beyin felci nedeniyle meydana gelen ölümlerin yaklaşık %60'ı, hastalar henüz acil müdahale alamadan gerçekleşmektedir (2).

Kesin olarak bir tedavisi bulunamamakla birlikte, en etkili müdahale ilk 4 saat içinde intravenöz olarak yapılan doku plazminojen aktivatörü (t-PA) uygulamasıdır (3). Bu uygulamayla damardaki pıhtı çözülerek, tıkanıklığın ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır. Bu nedenle akut uygulanabilecek ya da beyin felci sonrası geri dönüşümü arttırabilecek tedavilerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çerçevede en etkin çözümün hastalığa yakalanma riskini düşürmekten geçtiği düşünülmektedir. Bu bağlamda beslenme ve alışkanlıklarımız risk açısından önemli rol almaktadır.

Globalleşen dünyada yiyeceklere ulaşımın artması, hızlı ve çok miktarda tüketilen yağlı ve şekerli besinlerin günlük öğünlerde yüksek miktarda tüketilir hale gelmesi insan sağlığını tehdit eden bir durum oluşturmaktadır. Beslenme sonucu oluşan, hipertansiyon, kanda kolesterol ve trigliserid miktarının yüksek olması gibi durumlar da beyin felci için risk faktörü oluşturmaktadır (2). Diyabet ve hipertansiyonu olan hastalara, kan basıncını düşürecek uygulamalarda bulunulması sonucu beyin felci geçirme riskinin anlamlı şekilde düştüğü belirtilmiştir (4).

Yapılan bu tez çalışmasında, farklı diyet kısıtlamalarının beyin felcinde; hasar alanı, ödem, nöronal sağkalım ve apoptoz süreçlerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İskemik Beyin Felcinin Patofizyolojisi

Beyin dokusu canlılığını sürdürebilmek için gerekli olan enerjiyi oksidatif fosforilasyonla sağlamaktadır, bu nedenle yüksek oranda oksijen ve glikoza ihtiyaç duymaktadır. İskemik beyin felci sonucu, etkilenen bölgede serebral kan akımı ~%80 oranında düşmektedir. Bu düşüşle birlikte dokuların canlılığı için gerekli olan oksijen ve glikoz taşınamaz ve iyonik gradiyenti sağlayacak olan enerji temin edilemeyecektir (5). Enerji eksikliği sonucu nöron ve glia hücrelerinde membran potansiyeli bozulmakta ve nöronlar depolarize olmaktadır (6). Bunun sonucunda presinaptik voltaj-bağlı Ca^{+2} kanalları aktive olur ve eksisatör aminoasitlerin hücre dışı matrikse (HDM) salınımı gerçekleşir. Devamında eksisatör aminoasitlerin presinaptik uçta geri alınması enerji gerektiren bir süreç olduğundan, enerji yoksunluğu nedeniyle bu işlem gerçekleşemeyecek ve HDM'de glutamat etkisiyle aktive olan N-metil-D-aspartat (NMDA) ve metatropik glutamat reseptörleri hücre içine Ca^{+2} girişini artıracaktır (7). Glutamat aracılı uyarılma sonucu Na^{+} ve Cl^{-} iyonları *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) ve kainat reseptörleri aracılığıyla hücre içine girmektedir. Hücre içine giren Na^{+} ve Cl^{-} iyonlarını su, pasif olarak takip eder ve beyin ödemi oluşumunu indüklemektedir.

Genel ikincil haberci olan Ca^{+2} iyonlarının hücre içinde birikmesi, apoptoz gibi bir takım sitoplazmik ve nükleer süreçleri başlatarak, doku hasarına neden olmaktadır. Örneğin, proteolitik enzimlerin aktivasyonu ile aktin ve spektrin (8) gibi hücre iskeleti proteinlerinin ve laminin (9) gibi HDM proteinlerinin degradasyonu, fosfolipaz A2 ve siklooksigenazın aktivasyonu serbest oksijen radikallerinin üretimini uyarak, lipid peroksidasyonu ve membran hasarına yol açmaktadır.

Serbest radikal gidericileri kullanılarak, beyin felcinde oksidatif stres sonucu meydana gelen hasar azaltılabilmektedir (10). Ek olarak, endojen serbest radikal gidericilerin aşırı üretimi beyin felcine karşı koruma sağlamaktadır (11, 12). Serbest radikal giderici enzimleri hasarlı olan hayvanların serebral iskemik hasara daha duyarlı oldukları bilinmektedir (13, 14).

4.1.1 Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite

Beyin dokusu, total vücut ağırlığı ile karşılaştırıldığında en hafif dokulardan birisidir. Buna rağmen canlılığını ve fonksiyonlarını devam ettirebilmek için yüksek oranda oksijen ve glikoza gereksinim duymaktadır. Beyin, ihtiyacı olan enerjiyi oksidatif fosforilasyonla karşılaması sebebiyle beyin felci meydana geldiğinde beyne yeterli kanın, aynı zamanda oksijen ve glikozun taşınmaması ve iyonik gradientin sağlanması için gerekli enerjinin üretilmemesi (5) nedeniyle nöron ve glia hücreleri depolarize olurlar (6) ve devamında voltaj-bağlı Ca^{+2} kanalları da aktive olmaktadır. Kanalların aktivasyonu ile eksitasyon nörotransmitter olan glutamat HDM'ye salınır. Glutamat salınımının ardından, iyonotropik N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) veya kainat reseptörlerini aktive ederek (15, 16) hücre içine Ca^{+2} (7) iyonunun yüklenmesine neden olmaktadır. Enerji yokluğuna bağlı olarak depolarize olan membran sonucu HDM'ye hücreden K^{+} çıkışı olurken, hücre içine iyonotropik glutamat reseptörlerinden Na^{+} girişi gerçekleşir ve hücrede ödem meydana gelir. Glutamat reseptörlerinin bu aktivasyonu nöronları çoğunlukla nekroz yoluyla ölüme götürmektedir. Glutamatın HDM'deki bu aktivasyonu hasar çevresi bölgelere de yayılır ve ekzitotoksisite olarak adlandırılır.

4.1.2 Oksidatif stres

Hücre içi Ca^{+2} iyonu konsantrasyonunun artması, ikincil haberci sistemle birlikte hücre içi proteazları aktive etmektedir. Mitokondriyal membran geçirgenliğini bozan bu durum mitokondriyal ölümün gerçekleşmesine neden olmaktadır (17-19).

İskemi ile birlikte enerji açlığının meydana gelmesiyle meydana gelen ekzitotoksisite sonucu hücre içi Ca^{+2} iyon miktarının artması ve enerji açlığı nedeniyle mitokondrinin membran potansiyelini koruyamamasından dolayı mitokondri tarafından serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilmekte ve bu süreç sonunda da nöron ölümü gerçekleşmektedir (20, 21). Nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADPH) oksidasyonu hücre içerisinde Ca^{+2} 'nin birikmesine sebep olacak olayları tetiklediği gibi aynı zamanda mitokondriyal direnç oluşmasına sebep olur (22). NADPH'nin oksidasyonu, süperoksitlerin (SOR) birikimine yol açar ve

süperoksitlerin temizlenme kapasitesini düşürdüğü için oksidatif stresi kötüleştirir. Buna ek olarak glutasyon transferaz NADPH'nin oksidasyonuna eklenir ve mitokondriyal ölüme sebep olur (23).

4.1.3 Enflamasyon

Post iskemik enflamasyon arteriyel tıkanmanın gerçekleşmesinden hemen sonra damarsal alanda başlamaktadır. Siklooksijenaz-2'nin enflamatuvar hücrelerde ve nöronlardaki aktivasyonu sonucu SOR üretimi ve toksik prostanoidler nedeniyle doku hasarı meydana gelmektedir (24, 25). Aynı zamanda platelet birikiminin artması ve lökosit adezyonu iskemik hasarı daha da kötüleştirmektedir. İndüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) postiskemik enflamasyonda doku hasarını arttıran kritik bir etken olduğu da bilinmektedir (26). Oksidatif stres ve yangı düzenleyiciler kan beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğini etkileyerek proteinlerin ve endotel hücrelerinin damar dışına çıkmasını tetikleyip, makrofaj ve mast hücrelerinin aktivasyonuna neden olarak KBB yapısını bozmaktadırlar (27).

Proenflamatuvar sinyalden sonra selektinlerle, hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) membranda ifade edilmeye başlar (28, 29). Adezyon reseptörleri, adezyon molekülleriyle ve integrinlerle etkileşime girerek beyin dokusuna lökosit sızmasını sağlamaktadırlar. Beyin iskemisinin akut fazında mikroglia ve makrofajlar interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-18 hasarlı hücrelerden salınılmaktadırlar (30). Bu sitokinler hasarlı dokuda lökosit sızmasına katkıda bulunmakla birlikte, dendritik hücreler ve T-hücreleri arasında antijen sunumunu aktive ederler (31). T-hücreleri interferon-gama ve SOR vasıtasıyla immunitiyi başlatarak doku hasarına öncülük ederler. T-hücreleri, mikroglialar tarafından salınan IL-23 ile aktive olurlar ve makrofajlar tarafından üretilen IL-17 ile birlikte akut iskemik hasar daha kötü bir hal almaktadır (32). Yapılan araştırmalar, mikrogliaların çeşitli aktif formları olduğunu göstermektedir (33). Proenflamator tip olan M1, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , IL-1 β , IL-18 ve IL-6 salınımlarını gerçekleştirebilmektedir. Diğer yandan hücre iyileşmesiyle ilgili olan M2, hücre sağ kalım ve tamir mekanizmalarında etkili olmakla birlikte, *transforming growth factor* (TGF)- β , *nerve growth factor* ve IL-4 üretimini sağlamaktadır (34). M1 tipinin iskemik hasarın merkez bölgesinde ilk 24 saatte bulunduğu ve iskemik hasardan sonra ilk iki hafta sayılarını arttırdıkları (35),

M2 tip mikrogliaların ise ilk 24 saatin sonunda hasarlı alanda buldukları ve sayıları azalmadan önce ilk hafta boyunca giriş yaptıkları gözlemlenmiştir (36). Hasardan sonra ilk hafta boyunca M2 tipi iskemik hasarın merkez bölgesinde predominant olarak bulunurken, M1 tipi iskemik hasarın çevresinde predominant olarak bulunmuştur (37). Bu gözlemler, iskemik hasarın çevresinin proenflamatuvar ve aktive olmuş mikroglialar tarafından domine edildiğini göstermektedir (38).

4.1.4. Hücre ölüm çeşitleri; apoptoz, nekroz ve otofaji

Eksitotoksisite ve oksidatif stres sonucu hücrelerin aşırı uyarılması, membran potansiyellerinin bozulması, hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artması gibi durumlar, hücreleri nekroza ya da daha kontrollü bir savunma mekanizmaları olan apoptoz ve otofajiye götürmektedir.

4.1.4.1. Apoptoz

Apoptoz , hücre içi sinyal yollarla aktive olan kaskatlar sonucu meydana gelen programlı hücre ölümü şeklindedir. Bu ölüm mekanizması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin arasındaki sinyalizasyonlarla düzenlenmektedir (39). Hipoksi ve ATP açlığı, nöronları apoptotik regülatör proteinleri aktive etmeleri için uyardığı gibi, mitokondriyal disfonksiyonu, kaspaz enzimlerinin aktivasyonu, asidozis, kalsiyum dengesizliği ve diğer hücresel enerji metabolizma bozuklukları gibi süreçler için de uyarır (40, 41). Bu apoptotik olaylar çoğunlukla gecikmiş ve ikincil beyin hasarlarından sorumludurlar.

4.1.4.2. Nekroz

İskemi sonucu meydana gelen arteriyel tıkanma, hipoperfüzyona neden olmaktadır. Buna bağlı olarak beynin canlılığı için gerekli olan glikoz ve oksijen taşınması da büyük oranda azalmaktadır. Bunun sonucunda ATP üretimi yavaşlamakta ya da durmaktadır (42, 43). Arteriyel tıkanmadan birkaç dakika sonra, hücreye anormal Na^{+} girişi ve hücre dışına K^{+} çıkışının olmasıyla nöron ve gliaların membranlarında anoksik depolarizasyon meydana gelmektedir (44). Hücre içine giren Na^{+} sebebiyle suyun osmotik transportla hücre içine girmesi, sitotoksik ödem, hücre membranının parçalanmasına ve nekroza neden olmaktadır.

4.1.4.3. Otofaji

Otofaji, sitozolik içeriğin ve organellerin degradasyon için lizozomlara transfer edildiği çok yönlü katabolik bir süreçtir (45). Bu süreçte hasarlı ya da birikme eğilimindeki proteinler, organeller otofagozom formasyonu halinde lizozomla birleşir ve sindirilirler (46). Aynı zamanda otofaji sonucu sindirilen protein ya da organellerden elde edilen materyaller yeni sentez süreçlerinde tekrar kullanılarak, enerji eksikliğinde ya da besin yetersizliğinde hücrenin canlılığına destek olmaktadır (47). Otofaji sürekli olarak fonksiyonunu yitirmiş protein ve organelleri geri dönüştürerek hücre sel büyüme, farklılaşma ve hücre içi denge gibi fizyolojik süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır. Otofajide, başlama/indükleme, otofagozom formasyonu ve matürasyon/geri dönüşüm süreçleri bulunmaktadır (48). Kısaca özetlemek gerekirse; i) Ayırma: fagofor formasyonu ve sitoplazmik bileşenleri otofagozom içinde hapsedme; ii) Matürasyon: otofagozomun lizozom ile birleşmesi; iii) Degradasyon: lizozomal hidrolazlarla otofagozomun degradasyonu; iv) Geri dönüşüm: degrades olmuş sitoplazmik materyalin tekrar kullanımı. Oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve açlık gibi stres durumlarında hasarlı bileşen degrades edilmektedir.

İskemik stres sonucu otofaji indüklenebilir ancak iskemik stresteki rolü halen tartışma konusudur (49). Transmisyon elektron mikroskobu çalışmalarında, otofagozomlar ve otolizozomların iskemik alanda buldukları gösterilmiştir (50, 51). Yapılan araştırmalar sonucu otofajinin iskemik hasardan sonra beyin üzerinde hem yararlı hem de zararlı etkileri olabileceğini göstermektedir (52). İskemik süreçte üretilen serbest radikaller sonucu nöronal hücre ölümleri, KBB geçirgenliğinin bozulması ve nöronal hasar meydana gelmektedir (53). Elde edilen bilgiler doğrultusunda, iskemik beyin felci sonucu oluşan SOR'ların otofajiye, protein, lipid ve DNA gibi biyomoleküllerin posttranslasyonel modifikasyonunu sağlayarak aracı olduğunu göstermektedir (54, 55).

4.2. Beyin Felcinde Muhtemel Klinik Tedaviler ve Tedavide Karşılaşılan Zorluklar

İskemik beyin felcinde, akut tedavi olarak rekombinant doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve aspirin kullanılmaktadır (3, 56). İntravenöz olarak uygulanan t-PA, etkisini plazminojenin plazmine dönüşümünü indükleyerek göstermektedir (57) ve bunun sonucunda pıhtı çözülmekte ve damarın beslediği bölge kanlanmaya devam etmektedir. Böylece t-PA ile sağlanan reperfüzyon, nöronal hasarı azaltmaktadır. Literatüre bakıldığında t-PA'nın ilk 3 ve 4.5 saat aralığında anlamlı bir etki gösterdiği belirtilmiştir (3). Semptomlar başladıktan 4.5 saat sonra uygulanan t-PA sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir veri elde edilememiştir (58). Aynı zamanda 3 saat geçtikten sonra uygulanan t-PA uygulaması sonucu artmış beyin hasarı ile birlikte hemoraj riski de artmaktadır (59). Yapılan bir diğer çalışma ise farelerde yapılan beyin felci modelinde t-PA uygulamasının doza bağlı olarak beyindeki hasar alanını arttırdığı belirtilmiştir (60). Tüm bunların yanında t-PA iskemik beyin felci için etkili bir akut tedavi olarak görülsede iskemi semptomlarının başlama zamanının tam olarak bilinmemesi, ilaca erişimin kısıtlı olması, acil servis hizmetlerinin kalitesi, doza bağlı meydana gelebilecek yan etkileri nedeniyle iskemik beyin felci için kesin bir tedavi olamamaktadır.

Deneysel iskemi modellerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda hipotermi iskemik sonrası koruyucu rolü olduğu belirtilmiştir. İskemi sonrası hipotermi tedavisinin; p53 protein miktarını ve apoptozu indükleyen proteinlerin miktarını düşürdüğü gösterilmiştir (61-63). Hipotermi tedavisi iskemik sonrası apoptozu indükleyen proteinlerin miktarını düşürürken apoptozu engelleyen proteinlerin miktarını ise arttırdığı ve bu sayede apoptotik hücre ölümünü düşürdüğü gösterilmiştir (64, 65). Benzer deneysel çalışmalarda, hipotermi iyon dengesinin sağlanmasında Na^+-K^+ ATPaz pompasını düzenlediği, Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} kanalları üzerine etki ederek hücre içerisine aşırı miktarda Ca^{+2} girmesini engelleyerek apoptotik mekanizmaları inhibe ettiği gösterilmiştir (66, 67).

Trombolitik tedaviler her ne kadar serebral iskemi tedavisinde etkili bir uygulama olsa da, tedavilerdeki asıl amaç nöronların, nörodejenerasyondan korunması üzerinedir. Çünkü iskemiyi başlayan hücre ölümleri, iskemi bittiğinde de

hasar merkezi etrafındaki penumbra da devam etmektedir. Nöroproteksiyonda, yapılan birçok araştırma başarısız olsada (68), hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar umut verici niteliktedir (69). Ancak bu çalışmalarda sıklıkla karşılaşılan zorluklardan biri de, laboratuvardaki deneysel yaklaşımların, klinikte insanlar üzerine uygulanabilirliğidir (70). Örneğin, eritropoetin (EPO), böbrekten üretilir ve eritrosit üretimini indükler. Yapılan pilot bir çalışmada, beyin felci başladıktan 5 saat sonra hastalar üzerinde uygulanan EPO nun etkili sonuç verdiği belirtilmiştir (71). Diğer yandan yapılan bir başka çalışmada ise EPO uygulamasının olumlu bir etkisi olmadığı yönündedir (72).

Bir diğer çalışmada da beyin felci modeli uygulanmış hayvan modellerinde, magnezyum sülfat'ın koruyucu etkisini göstermektedir (73). 2013 verilerine göre, bir takım araştırmalar magnezyumun ikna edici bir yararının olmadığını söylerken (74, 75), yapılan bazı çalışmalarda, magnezyumun koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedir (76, 77).

4.3. Diyet Kısıtlaması

Kalori restriksiyonu ya da diğer adıyla diyet kısıtlamasının birçok kronik hastalığın başlamasını geciktirdiğini, mevcut olan hastalıklarında semptomlarını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu diyet kısıtlaması, günlük alınması gereken kalori miktarının düşürülmesi şeklinde olabildiği gibi, belli temel besin maddelerinin kısıtlanması (protein, yağ, karbonhidrat) şeklinde de olabilmektedir. Diyet kısıtlamasıyla ilgili 1935'li (78) yıllarda sıçanlarla başlayan çalışmalar günümüzde de halen devam etmektedir.

Altı aylık Fischer-344 (F344) sıçanlarında uygulanan %40'lık diyet kısıtlaması sonucu, sıçanların ömrünün anlamlı şekilde uzadığı görülmüştür (79). Başka bir çalışmada da, 12 aylık olan C57BL/6 ve B10C310 gibi iki farklı fare soyuna uygulanan %40'lık kalori kısıtlamasında ömür uzunluğunun anlamlı bir şekilde arttığı belirtilmiştir (80). Kansere üzerine 1999 yılında yapılan bir çalışmada kalori kısıtlamasıyla beslenen 12 aylık C57BL/6 farelerde, kontrol grubuyla kıyaslandığında kanser gelişimini anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. (81). Ek olarak p-53 hasarlı, spontan ya da uyarılabilir tümör gelişimine duyarlı, 10 aylık

farelerde yapılan %40'lık kalori kısıtlaması ve her hafta bir gün açlık uygulaması sonucu, tümör gelişimini anlamlı şekilde azalttığı belirtilmiştir (82).

Kalori kısıtlanmasının ileriki yaşlarda olan etkisine bakıldığında ise, 24 aylık farelere uygulanan 10 günlük %40'lık kalori kısıtlaması sonucu yaşlanmış böbrekte, serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidaz COX-2 aktivitesi, *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) ve iNOS üretiminde düşüş görülmüştür (83). Bir diğer araştırmada ise, 26 aylık C57BL/6 dişi farede yaşa bağlı gelişen kardiyak hipertrofi ve diyastolik fonksiyon bozukluğu , 10 hafta uygulanan %30'luk kalori kısıtlaması sonucu olumlu yönde etkilendiği yönündedir (84).

Diyet kısıtlamasının davranış üzerine etkilerine bakıldığında, 2007 yılında yapılan bir araştırmada, 18 aylık sıçanlara, 6 ay boyunca uygulanan %40'lık kalori kısıtlaması sonucu, spontan motor aktivite (açık alan) ve öğrenme ve uzaysal hafıza (*Morris'in su tankı*) testlerinde olumlu yönde etki gözlemlenmiştir (85). Gün aşırı beslenmenin fonksiyonel davranışlar üzerine etkilerinin incelendiği bazı çalışmalarda örneğin, 21 aylık erkek Wistar sıçanlarına uygulanan 3 aylık gün aşırı beslenme motor koordinasyon (rotarod) ve kognisyon testlerinde anlamlı iyileşmeler gözlenmiştir (86). Bir başka çalışmada da 7 haftalıkken gün aşırı beslenme uygulamasına başlanan CD-1 farelerin, normal yemle beslenen kontrol gruplarına oranla, 11 aylıkken yapılan *maze-learning* ve *fear conditioning* testlerinde daha iyi performans sergiledikleri ve beyinlerinde daha az miktarda oksidatif stres belirteçlerine sahip oldukları rapor edilmiştir (87).

Kalori kısıtlamasının ileri yaşlardan sonra başlaması sonucunda iyileştirici etkisi bilinsede, literatürdeki bir araştırmaya göre süttten kesildikten sonra %40'lık kalori kısıtlaması uygulanan 19 aylık farelerde öğrenme ve hafıza performanslarında gelişim gözlenmiştir (88). Hafıza üzerine bir diğer araştırmada 18 aylıkken %40'lık kalori kısıtlaması uygulanan sıçanlarda 24. aya gelindiğinde, öğrenme ve hafıza alanlarında Morris'in su tankı testinde gelişme gözlemlenmiştir (85). Son olarak 24 aylık Wistar sıçanlara, 3 aylık aralıklı beslenme uygulanması sonucu Morris'in su tankı testinde öğrenme ve hafıza alanlarında gelişim görülmüştür (86). Bunların yanında, kısa dönemli kalori kısıtlaması sonucu Morris'in su tankı testinde herhangi bir anlamlı değişim izlenmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, 6 hafta

boyunca aralıklı beslenme uygulanan genç Wistar sıçanlarına yapılan bir hafıza testinde anlamlı bir değişim gözlemlenmediği belirtilmiştir (89, 90). Bir diğer çalışmada ise, sütten kesildikten sonra %25'lik kalori kısıtlaması uygulanan Sprague Dawley sıçanlarında 5-10 ve 18 aylıkken uygulanan Morris'in su tankı testinde anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir (91).

Kalori kısıtlamasının yara iyileşmesi üzerine olan araştırmalarda literatürde mevcuttur. Önceki dönem çalışmalara bakıldığında fare (92) ve sıçanlarda (93) kalori kısıtlaması sonucu yara iyileşme hızının yavaşladığı gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarına bakıldığında da benzer bir durum söz konusudur. Devamlı ya da gün aşırı beslenme yoluyla birkaç hafta %33'lük kalori kısıtlaması uygulanan farelerden alınan hücrelerde azalmış proliferasyon görüldüğü belirtilmiştir (94). Yara iyileşmesinde önemli bir rol oynamasından dolayı kollajen üretimine odaklanan çalışmalarda, birkaç günlük kalori kısıtlaması sonucu kollajen üretiminin azaldığı geçmiş çalışmalarda gösterilmiştir (95). Protein kısıtlamasının yara iyileşmesini üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, 12 haftalık erkek ve dişi sıçanlara 12 hafta boyunca %23'ten %100'e kadar uygulanan protein kısıtlaması sonucu yara iyileşmesi kısıtlanan doza bağlı olarak etkilenmiştir (96). Aynı zamanda kalori kısıtlamasının yara iyileşmesi üzerine ters bir etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, abdominal kesik modeli uygulanacak sıçanlara operasyondan 7 gün önce %62'lik kalori kısıtlamasıyla muamele edildiğinde, yara bölgesindeki kas protein sentezinde, aynı zamanda operasyondan 2 ve 7 gün sonra aynı bölgedeki çekme gücü ve kollajen içeriğinde anlamlı bir etki görülmediği belirtilmiştir (97). Bir başka araştırmada her 2 haftada 4 günlük açlığa maruz kalan genç farelerde, kalori kısıtlamasının yara iyileşmesine olan zararlı bir etkisi gözlemlenmemiştir (98).

Gün aşırı beslenmenin vücut fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırıldığı 2003 yılında yapılan bir araştırmada, genç sıçanlara uygulanan 6 aylık gün aşırı beslenme sonucu, hayvanların kan basıncında ve kalp vurumunda düşme izlenmiştir (99). Bir başka araştırmada da, sıçanlara uygulanan 1 aylık gün aşırı diyet sonucu kardiyak fonksiyonlarında daha iyi bir otonomik-kontrol geliştiği gözlemlenmiştir (100).

Diyet kısıtlamasında yüksek yağlı diyet ile beslenmeye bakıldığında, 90'lı yıllardan itibaren günlük diyetdeki yağ alımının artmasıyla (101), 21.yy başlarındaki obezite oranı, 80'li yıllarla kıyaslandığında neredeyse iki katına çıkmıştır. Bunun da insan sağlığını tehdit eden bir durum oluşturduğu bilinmektedir. Yapılan hayvan çalışmalarında obezite sonucu meydana gelen rahatsızlıkların insanlardakiyle benzer olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde metabolik sendrom (102-105), öğrenme ve hafıza bozukluklarının (106) yanı sıra depresif (107-110) ve anksiyetif davranışlar (111-114) geliştirdikleri, literatürde yapılan çalışmalarda görülmektedir.

Dahası yüksek yağlı diyet kemirgenlerde, farklı beyin bölgelerinde; mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu uyarabilmekte (115, 116), sitokin ekspresyonunu arttırabilmekte (117, 118) ve serebral damarsal fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır (119, 120).

Yüksek protein içerikli diyetle beslenme sonucu karaciğerde (121-124) ve adipoz dokuda (121-123, 125) lipid depolanması azalmaktadır.

4.4.Diyet Kısıtlaması ve İskemi

Beyin felcinde, meydana gelen enerji açlığı ile birlikte mitokondri fonksiyonlarının bozulması ve SOR'ların üretilmesiyle birlikte nöronal ölümlerin gerçekleştiği daha önceden belirtilmişti (20, 21).

Kalori kısıtlaması ve gün aşırı beslenme, oksidatif hasarı; mitokondriyal SOR'ları azaltarak, antioksidan seviyesini arttırarak ve oksidasyon sonrası hasar görmüş moleküllerin onarımını sağlayacak mekanizmaların aktivasyonunu arttırarak önlemektedir (126). Literatürdeki araştırmalardan bazıları, kalori kısıtlaması yapılmış kemirgenlerdeki dokularda, düşük seviyede mitokondriyal SOR bulunduğunu göstermiştir (127, 128). Ek olarak, çeşitli stres uyarımları sonucu aktive olan bir molekül olan *heme oxygenase-1* (HO-1) , gün aşırı beslenme durumunda da aktive olmaktadır (129) ve fokal iskemi geçirmiş fare beyinde koruyucu etkisi olacak olan antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri bulunmaktadır (129). Kemirgenlerde yapılan beyin felci çalışmalarında 3 aylık ya da daha uzun süreli diyet kısıtlamasının hem beyin felcinde (130) hem de eksitotoksisitede (131-133)

koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, uzun dönemli diyet kısıtlaması sonucu, nörotrofik ve büyüme faktörlerinin etkinliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), uzun dönemli diyet kısıtlaması sonucu indüklenmektedir (134, 135). Yapılan çalışmalarda BDNF'nin iskemi sonrası nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir (136, 137). Uzun süreli diyet kısıtlamasının aynı zamanda kalp gibi diğer organlarda meydana gelen iskemik hasarlar karşısında yararlı etkisi bulunmakla birlikte, bu etkisini; immunosupresyon, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin giderilmesini sağlayan mekanizmaların etkinliğini ve ısı şok protein seviyesini arttırarak başarmaktadır (138, 139). Karaciğer ve böbrek üzerinde yapılan, 2 haftalık %30 diyet kısıtlaması ve 3 günlük açlık (sadece su ile beslenme) çalışmaları sonucu iskemi-reperfüzyon hasarlarında koruyucu etki görüldüğü belirtilmiştir (140). Aynı zamanda protein kısıtlaması ya da triptofan gibi tek bir aminoasit kısıtlamasının 6 gün gibi kısa bir sürede yararlı sonuçlar gösterdiği söylenmektedir (141). Yapılan hipoksi ve global beyin iskemisi modellerinde sadece su ile besleme yapılan açlık diyetinin koruyucu olduğu söylenmektedir (142-146).

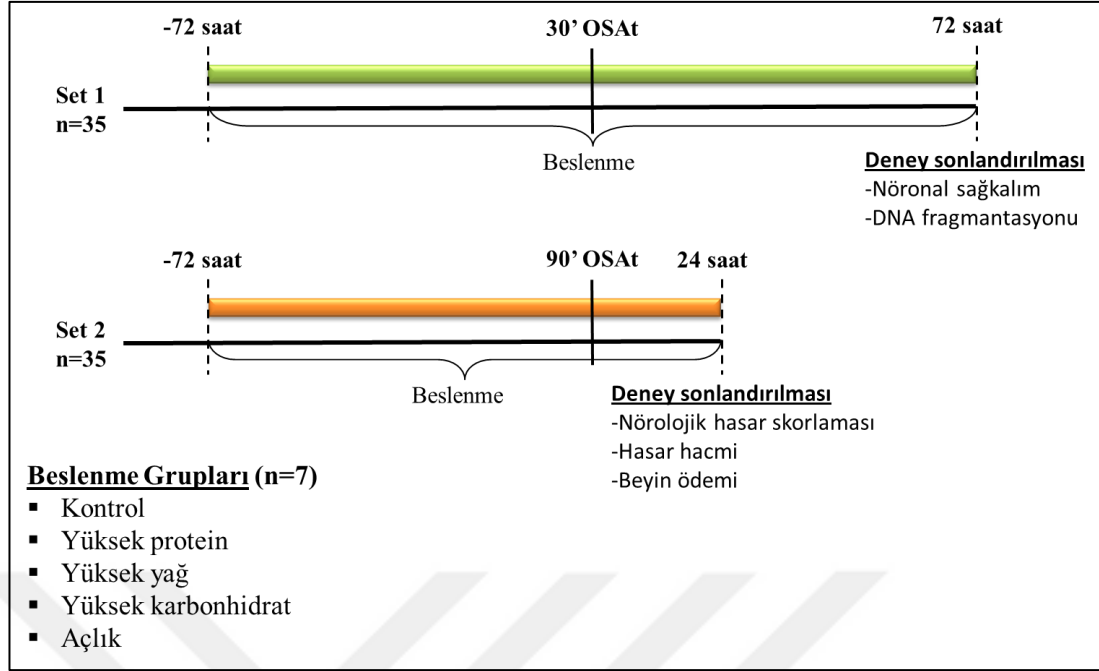
Görüldüğü üzere diyet kısıtlamasının, insan metabolizmasında, iç dengede ve sürdürülebilir hayat içerisinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu bağlamda diyet kısıtlamasının dünya sağlık örgütünün verilerine göre 2015 yılında yaklaşık 6 milyon kişinin ölümüne yol açan beyin felcinin süreçleri üzerine etkisi olduğu düşünülebilir.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Deney Dizayını

Bütün deney prosedürleri İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönetmeliklerine uygun olarak düzenlenmiştir. Deneylerde kullanılan hayvanlar günlük sirkadiyen ritme uygun olacak şekilde 12 saat aydınlık/karanlık koşullarında muhafaza edildi.

Deney hayvanı olarak 8-12 haftalık, yaklaşık 26-32 gr ağırlığındaki BALB/c fareler kullanılıp, ilgili gruplara rastgele dağıtıldı. Kontrol (standart yem), yüksek protein (%70 protein, %10 karbonhidrat, %10 yağ), yüksek yağ (%70 yağ, %10 protein, %10 karbonhidrat), yüksek karbonhidrat (%70 karbonhidrat, %10 protein, %10 yağ) ve açlık (sadece su) şeklinde düzenlenen gruplara 90 dakika veya 30 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAT) modeli uygulandı. Hayvanların özel diyetle beslenme periyotları operasyondan üç önce olacak şekilde başlatıldı. Üç gün boyunca deney gruplarına göre hazırlanmış diyetlerle beslenen farelere, üçüncü günün sonunda 90 dakika ve 30 dakika OSAT modeli uygulandı. 30 dakika OSAT 72 saat reperfüzyon modeli uygulanan açlık grubu hayvanları, operasyondan sonra 48 saat reperfüzyon periyodunda öldüklerinden dolayı bu grup, bir gün açlık yapıldıktan sonra operasyona alınmıştır. Hayvanlar iskemi modelinin protokolüne göre 90 dakika için 24 saat sonra, 30 dakika için 72 saatin sonunda izofloran ile anestezide alınarak dekapite edildi. Hemen ardından beyinler çıkarılarak kuru buzda donduruldu. 90 dakika OSAT'da ek olarak dekapitasyon öncesi hayvanların nörolojik hasar skorları ölçüldü. Kuru buzda dondurulan beyinler, kryostat (soğuk alan mikrotomu, CM1950, Leica, Almanya) ile 18 µm kalınlığında kesilerek, daha önceden ısıtıcı tabla üzerinde bekletilen pozitif yüklü lamlara alındı. Lamlara alınan kesitler daha sonra histokimya ve immunofloresan boyamalar için kullanıldı.



Şekil 5.1.1. Deneş dizaynı. OSAT: Orta Serebral Arter Tıkanması.

5.2. Beslenme

Yetişkin 8-12 haftalık BALB/c fareler özel beslenme tiplerine göre, her kafeste 2 hayvan olacak şekilde ayrıldı. Gruplar arasında günlük meydana gelebilecek değişimleri önlemek adına bir günlük operasyon periyodu için her gruptan 2 hayvan kullanıldı. Operasyondan üç gün önce başlatılan beslenme sürecinde, her bir operasyon günü için hayvanlar, bir sonraki gün beslemeye alınarak, her hayvanın eşit gün beslenmesi sağlandı. Diyet malzemeleri laboratuvarında, normal yaşantıda kullanılan malzemelerden hazırlandı. Hazırlanan diyetlerde seçilen besin maddesi yoğunluğu, yaklaşık %70 olacak şekilde ayarlandı.

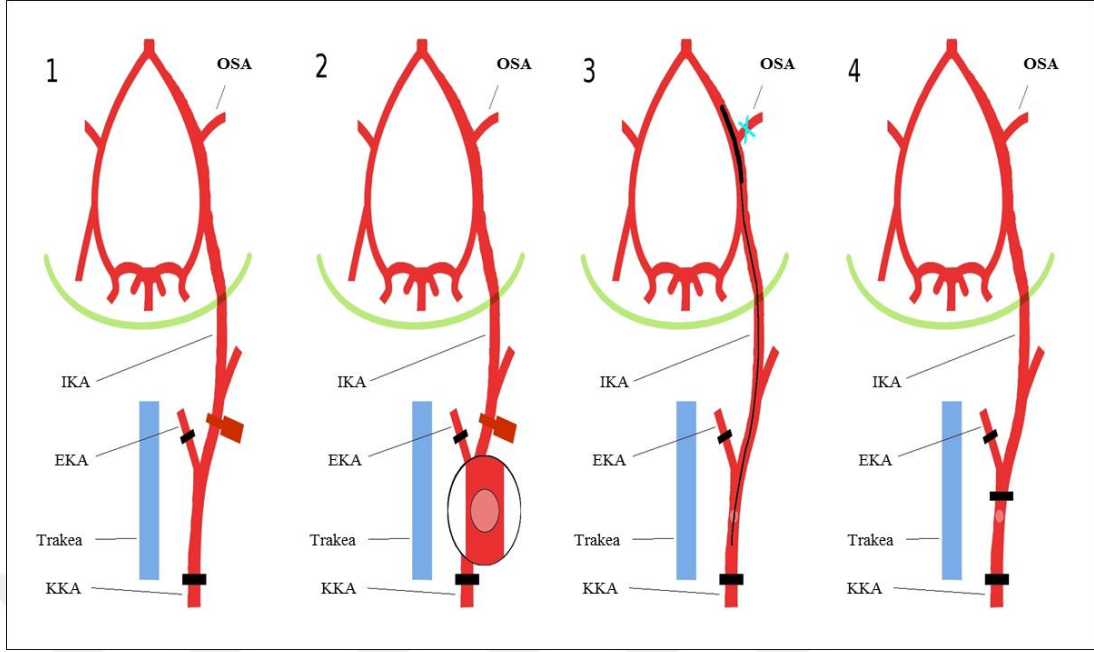
Gruplara göre yemlerin içeriğı aşağıdaki şekildedir:

- Kontrol (40 gr standart yem (Altromin 1324 maintenance diet,mice), 20 ml su),
- Protein (40 gr kazein (Casein, Optimum Nutrition), 3.72 ml ayçiçek yağı, 65 ml su),
- Yağ (5.24 gr kazein, 30 gr katı yağ, 6.4 ml ayçiçek yağı, 3.5 gr sukroz),
- Karbonhidrat (5.24 gr kazein, 4.32 ml ayçiçek yağı, 30 gr sukroz, 7 ml su).

5.3. Beyin Felci Metodu

Yetişkin 8-12 haftalık BALB/c fareler, %2 izofloran ile anesteziye alındı (%30 O₂, geri kalan N₂O). Deney süresince hayvanların vücut sıcaklıkları ölçülüp, geri-bildirim yoluyla çalışan ısıtıcı (507221F, Harvard Apparatus, ABD) yardımıyla 36.5-37.0 °C'ta tutuldu. Orta serebral arter tıkanması süresince, serebral kan akımı ve sonrasındaki reperfüzyon, direk kafatasında orta serebral arter bölgesine (Bregma: posterior 2 mm, lateral 6 mm) yapıştırılmış, esneyebilen 0.5 mm fiber-optik kablo (PROBE 418-1, Perimed, İsveç) kullanılarak laser doppler flowmetri (LDF) (PeriFlux Sistem 5000, Perimed, İsveç) sistemi ile görüntülendi. Fokal iskemi intraluminal filament tekniği kullanılarak yapıldı (147). Kısaca, boyun bölgesi orta hattan bir kesit atılarak açıldı ve tükürük bezleri iki tarafa ayrıldı. Kommon karotid arter ve eksternal karotid arter izole edildi ve sonrasında bağlandı. Bir mikrovaskular klips (FD562R, Aesculap, Almanya) yardımıyla internal karotid arter geçici olarak kapatıldı. Ardından, kommon karotide bir kesit atıldı, 185-190 µm kalınlığında silikonla kaplı naylon monofilament 7-0 (P0812, Doğan, Türkiye) damar içine sokuldu ve internal karotid arterde bulunan mikrovaskular klipse kadar itildi.

Ardından mikrovaskular klips kaldırılarak bifurkasyondan itibaren direnç hissedilinceye kadar yaklaşık 9 mm OSA bölgesine kadar itildi. İskeminin başarıyla indüklendiği anlık yapılan kayıttaki beyin kan akımındaki düşüşle teyit edildi (**Şekil 5.3.1**).



Şekil 5.3.1. Orta serebral arter tıkanması metodu. CCA: Kommon Karotid Arter, ECA: Eksternal Karotid Arter, ICA: İnternal Karotid Arter.

90 dakika (24 saat reperfüzyon) ya da 30 dakika (72 saat reperfüzyon) iskemi sonrası monofilament geri çekilerek iskemi sonlandırıldı. Reperfüzyonu görebilmek adına, 90 dakika iskemi için 30, 30 dakika iskemi içinse 20 dakika daha LDF kaydı alınmaya devam edildi. Bu sürelerin sonunda hayvanların boynu 5-0 ipek ipele (S2185, Doğan, Türkiye) dikildi ve hayvanlar kendi kafeslerine alındı.

5.4. Nörolojik Hasar Skorlaması

Nörolojik skorlama 90 dakika OSAT ve 24 saat reperfüzyon sonrası hayvanların nörolojik durumları aşağıda belirtilen puanlama sistemine göre değerlendirildi.

0 = Normal fonksiyon

1 = Hayvan kuyruktan tutulup kaldırıldığında gövde ve kontralateral ön ayağın fleksiyonu

2 = Hareket halindeken kontralateral tarafa doğru dönme, dinlenme halinde normal postür

3 = Dinlenme halinde kontralateral tarafa doğru yaslanma

4 = Doğal motor aktivite eksikliği (147)

5.5. İmmünohistokimya ve İmmünofloresan Boyamaları

5.5.1. Cresyl violet boyaması, hasar alanı ve beyin ödemi hesaplanması

Hasar alanı ve beyin ödemi hesaplamaları için *cresyl violet* boyaması yapıldı. 90 dakika OSAT-24 saat reperfüzyon ve 30 dakika OSAT-72 saat reperfüzyon sonrası izofloran ile bayıltılıp dekapite edilen hayvanların beyinleri çıkarılıp kuru buzda donduruldu. Ardından kryostat yardımıyla 18 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Bu kesitler 90 dakika OSAT için, birbirlerine eş 2 mm uzaklıkta olan (bregma +2.0, 0.0 - 2.0 ve -4.0) dört beyin bölgesinden alınırken, 30 dakika OSAT için bregma 0.0 mm seviyesinden alındı. Beyinlerin kryostat ile kesiminin ardından, kesitler ısıtıcı tabla (HP-LP1, WiseTherm, Almanya) üzerinde 40 °C de ısıtılmış olan pozitif yüklü lamlara (Isoterm, Almanya) alındı. Alınan kesitler yaklaşık 30 dakika daha sıcak tabla üzerinde bekletilerek ısı ile kesitlerin lam üzerine tesbiti sağlandı.

Cresyl violet boyamasında standart histolojik boyama prosedürü kullanıldı. Kısaca; kesitler %4 paraformaldehit (PFA, 158127, Sigma Aldrich, ABD) ile fikse edilip sonrasında 0.1 M fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Yıkamanın ardından *cresyl violet* ile boyanan kesitler, yükselen alkol serisinden geçirilerek en son ksilende (534056, Sigma Aldrich, ABD) bekletilip son olarak entellan (1.079.610.500, Merck Millipore, ABD) ile kapatıldı.

90 dakika OSAT 24 saat reperfüzyon sonrası *cresyl violet* ile boyanan kesitler tarayıcı ile tarandıktan sonra resim analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak hasar alanı ve ödem analizleri yapıldı.

5.5.2. DNA fragmentasyon analizi

DNA kırıklarının belirlenmesi ve ölçümü için *terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling* (TUNEL, 11684795910, Roche, ABD) kiti kullanıldı. 30 dakika OSAT 72 saat reperfüzyon yapılan hayvanlardan alınan beyin kesitleri %4 PFA ile fikse edilip, 0.1 M PBS ile yıkandı, antijen geri kazanımı sitrat ile sağlandı, bloklama normal keçi serum (NGS, G9023, Sigma Aldrich, ABD) ile yapıldıktan sonra TUNEL karışımıyla reaksiyona sokuldu ve son olarak hücre

çekirdeklerini görüntüleyebilmek için *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) ile boyandı. Boyanan kesitlerdeki TUNEL pozitif hücreler, striatum bölgesinden rastgele seçilen 62.500 μm^2 alanındaki 9 bölgede sayıldı.

5.5.3. Nöronal sağkalım analizi

30 dakika OSAT 72 saat reperfüzyon yapılan hayvanlardan alınan beyin kesitleri 15 dakika %4 PFA ile fikse edilip, 0.1 M PBS ile yıkandı, bloklama NGS ile yapıldıktan sonra oda sıcaklığın 1 saat NeuN primer antikoruyla (MAB377c3, Millipore, ABD) inkübe edildi. Kesitler daha sonra 0.1 M PBS ile yıkandı, ve son olarak hücre çekirdeklerini görüntüleyebilmek için DAPI ile boyandı. Boyanan kesitlerdeki NeuN pozitif hücreler, striatum bölgesinden rastgele seçilen 62.500 μm^2 alanındaki 9 bölgede sayıldı.

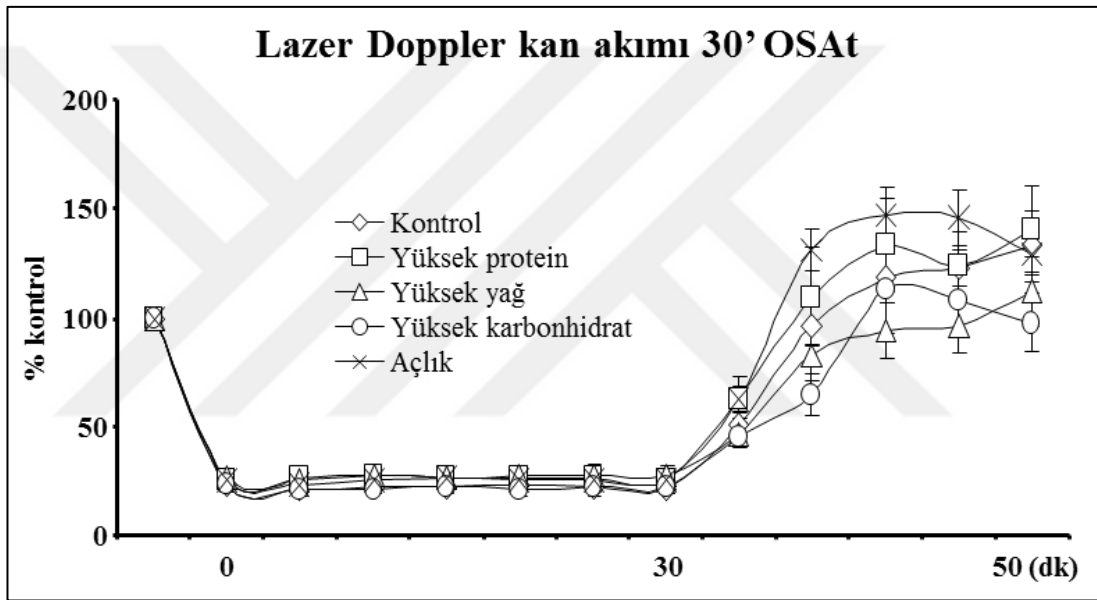
5.6. İstatistik

Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi amacıyla SPSS programı kullanılarak istatistiksel test yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar *one-way* ANOVA kullanılarak, *LSD* testiyle analiz edilmiştir. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş, * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir .

6. BULGULAR

6.1. Lazer Doppler Flowmetri

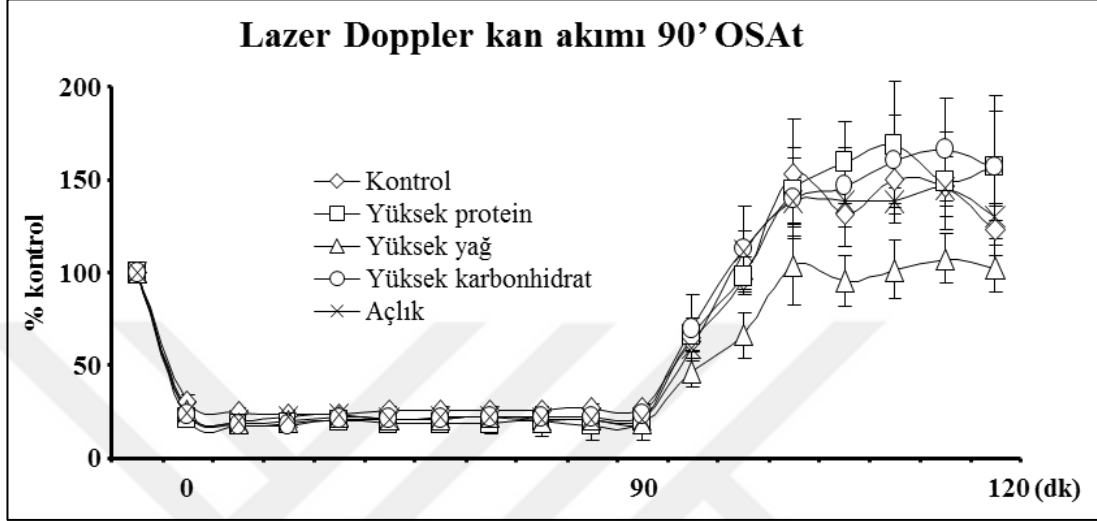
Deneysel iskemi modelinin oluşturulması, hasar süresinin kontrolü ve reperfüzyondaki kanlanmanın değerlendirilebilmesi için hayvanların serebral kan akımları LDF cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Beyin kan akımı, iskeminin indüklenmesinden yaklaşık 10 dakika önce başlayıp, 30 dakika iskemi boyunca ve bunu takiben 20 dakika reperfüzyon süresi boyunca OSA bölgesinden (Bregma: posterior 2 mm, lateral 6 mm) ölçüldü.



Şekil 6.1.1. 30 dakika iskemi seti için orta serebral arter bölgesinden alınan Lazer Doppler kan akımı (LDF) kaydı.OSAT modelinde hasarın 30 dakika ile sınırlandırıldığı ve beyin kan akımının %80 düşüşünü göstermek için LDF kaydı alındı

30 dk iskemi modeli uygulanan deney setindeki kan akımlarına bakıldığında. İskeminin indüklenmesinden sonra beyin kan akımı operasyon öncesi değerden yaklaşık olarak %80 oranında düştüğü gösterildi. 30 dk OSA takiben filamentin geri çekmesi ile gerçekleştirilen reperfüzyon esnasında beyin kan akımının kontrol, yüksek protein, yüksek yağ, yüksek karbonhidrat ve açlık gruplarında arttığı gösterildi.

90 dk iskemi modeli deney seti için yapılan operasyonlar için OSA bölgesinden (Bregma: posterior 2 mm, lateral 6 mm) beyin kan akımı ölçümü yapıldı. LDF kaydı beyin felci başlangıcından 10 dk önce başlayıp, 90 dk iskemi süresince ve reperfüzyonun hemen başlangıcından itibaren 30dk süresince alınmıştır.



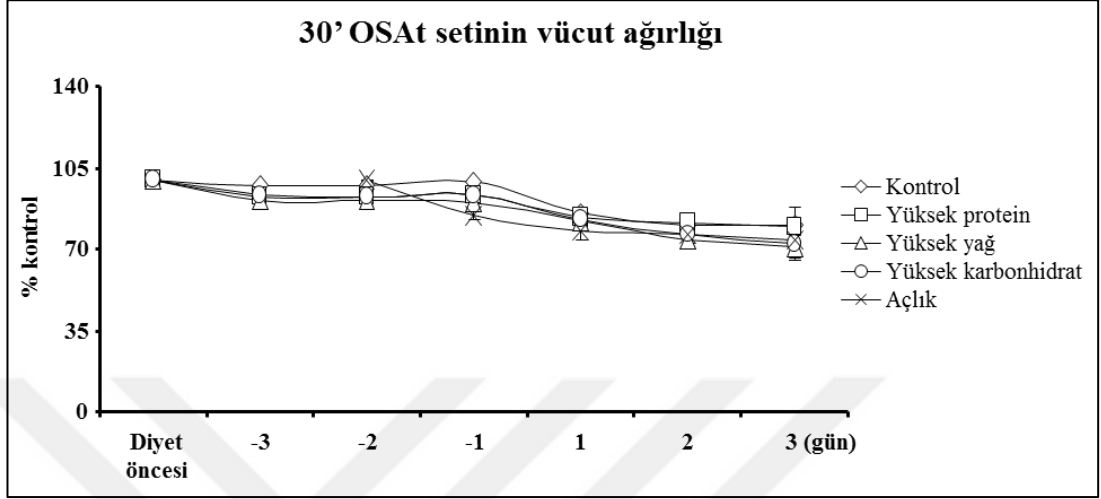
Şekil 6.1.2. 90 dakika iskemi seti için orta serebral arter bölgesinden alınan Lazer Doppler kan akımı (LDF) kaydı. OSAT modelinde hasarın 90 dakika ile sınırlandırıldığı ve beyin kan akımının %80 düşüşünü göstermek için LDF kaydı alındı

90 dk iskemi modeli uygulanan deney setindeki hayvanların beyin kan akımları OSA girişinin filament ile tıkanması ile birlikte %80 oranında düştüğü, 90 dk operasyon süresince beyin kan akımının sabit kaldığı ve filamentin geri çekilmesi ile birlikte gerçekleştirilen reperfüzyon esnasında kan akımının tekrardan arttığı kontrol, yüksek protein, yüksek yağ, yüksek karbonhidrat ve açlık gruplarında gözlemlendi.

6.2. Diyete Bağlı Kilo Oranlarının Takibi

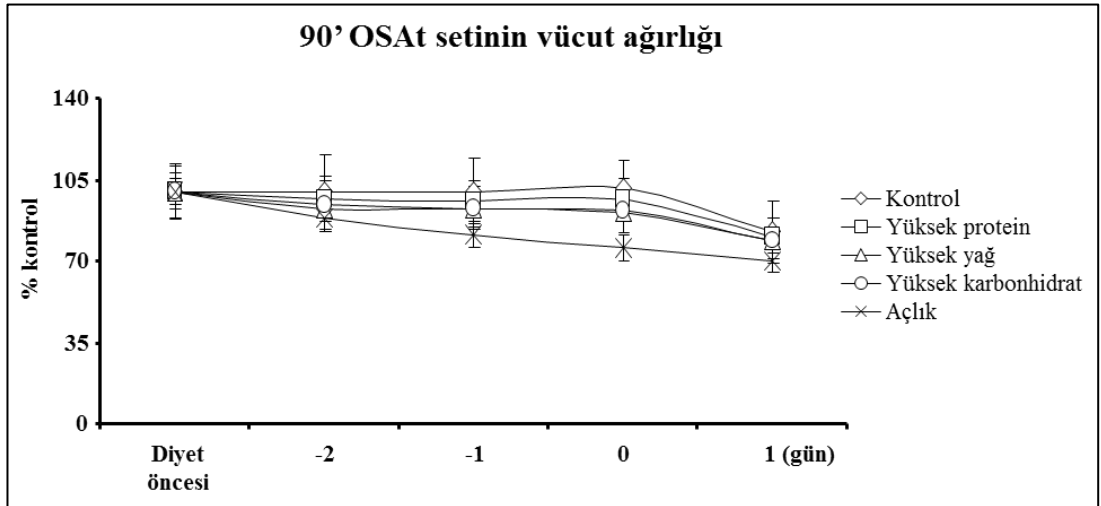
Hayvanlara uygulanan diyetlere bağlı olarak beyin felci operasyonu öncesinde ve sonrasında günlük olarak hayvanların kilo takibi yapıldı. Gruplarına göre hazırlanan diyetlerle beslenen farelere 90 dakika veya 30 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAT) modeli uygulandı. Hayvanların özel diyetle (Kontrol (standart yem), yüksek protein (%70 protein, %10 karbonhidrat, %10 yağ), yüksek yağ (%70 yağ, %10 protein, %10 karbonhidrat), yüksek karbonhidrat (%70 karbonhidrat, %10 protein, %10 yağ)) beslenme periyotları operasyondan üç gün

önce olacak şekilde başlatıldı. 30 dk OSA tıkanması takiben 3 günlük reperfüzyon sırasında (Şekil 6.2.1) ve 90 dk OSA tıkanması takiben 1 günlük reperfüzyon (Şekil 6.2.2) sürelerinde deney hayvanlarının kilo takibi yapıldı.



Şekil 6.2.1. 30 dk OSA tıkanması deney seti kilo takibi.

Diyet değişikliği sonrası kontrol grubunun ağırlık değişimi operasyona girene kadar diğer gruplarla kıyaslandığında daha stabil olduğu gözlemlendi. Açlık grubundaki hayvanların ağırlıklarının ilk günden sonra düzenli olarak düştüğü görüldü. Operasyon sonrası tüm gruplardaki hayvanların ağırlıklarında bir düşüş gözlemlendi.

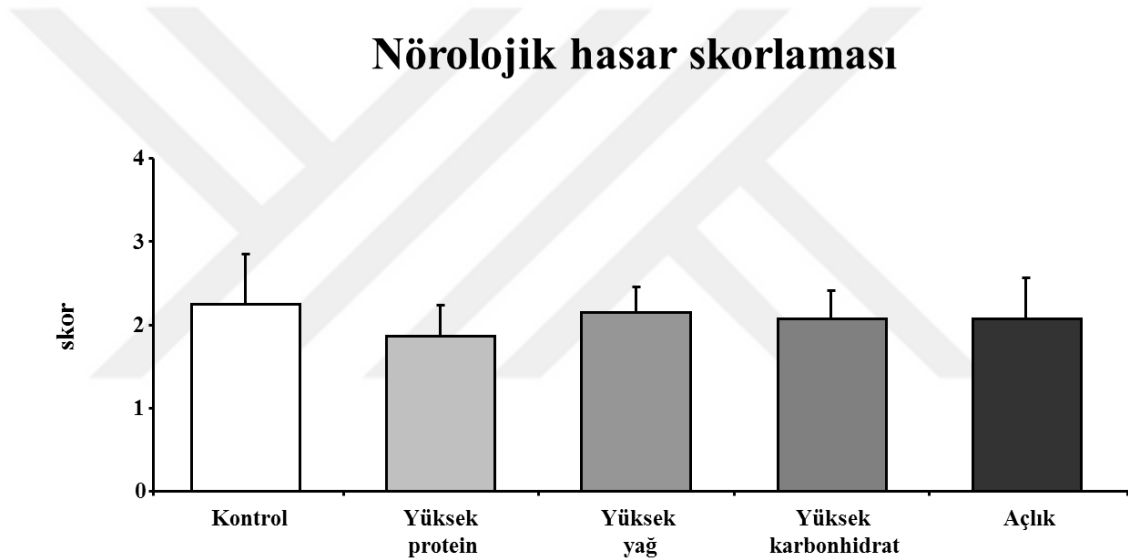


Şekil 6.2.2. 90 dk OSA tıkanması deney seti kilo takibi.

Diyet değişikliği sonrası aynı 30 dk setinde olduğu gibi, kontrol grubunun ağırlık değişimi operasyona girene kadar diğer gruplarla kıyaslandığında daha stabil olduğu gözlemlendi. Açlık grubundaki hayvanların ağırlıkları ilk günden sonra düzenli olarak düşmüştür. Operasyon sonrası tüm gruplardaki hayvanların ağırlıklarında bir düşüş gözlemlendi.

6.3. Nörolojik Hasar Skorlaması

Nörolojik hasarın skorlanması için 90 dakika iskemi setindeki hayvanlara 24 saat sonra sakrifiye edilmeden hemen önce bu test uygulandı ve aldıkları skorlar kaydedildi (Şekil 6.3.1).

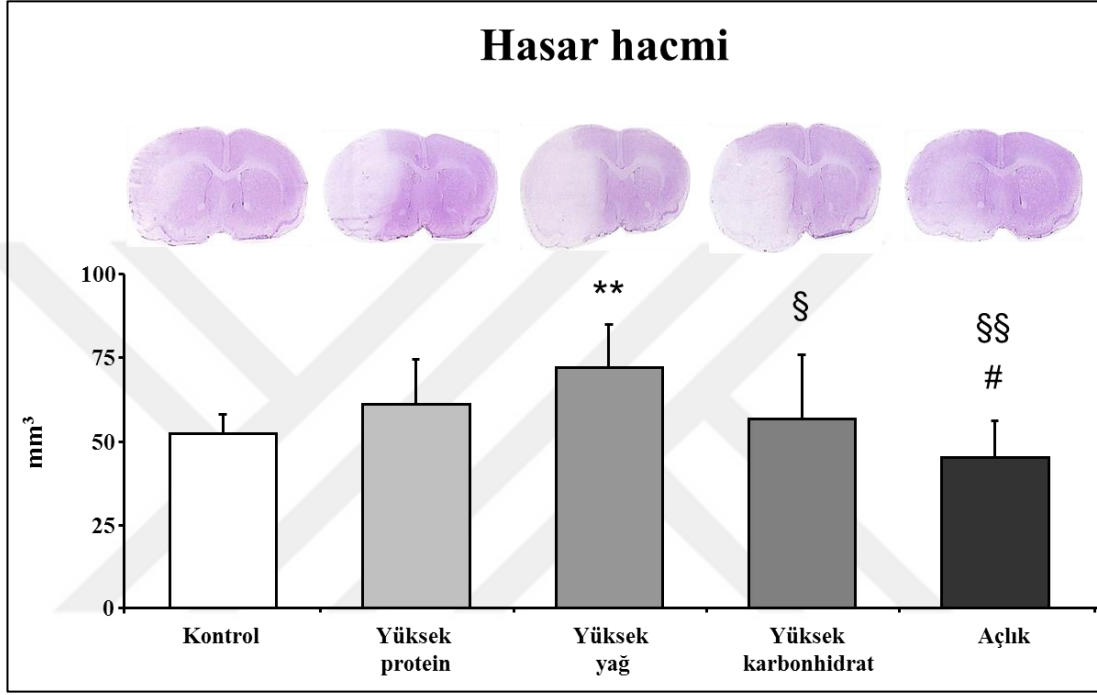


Şekil 6.3.1. Nörolojik hasar skorlaması.

Sonuçların değerlendirilmesi sonucu gruplar arasında bir fark görülmemiştir.

6.4. Hasar Hacmi

Hasar hacminin belirlenmesi için 90 dakika iskemi setindeki hayvanların birbirine 2.0 mm uzaklıktaki 4 farklı bölgeden alınan beyin kesitleri *cresyl violet* ile boyanmış, boyanan kesitler tarayıcı yardımıyla taranmış, daha sonra Image J programı yardımıyla hasar alanları hesaplanmıştır (Şekil 6.4.1).

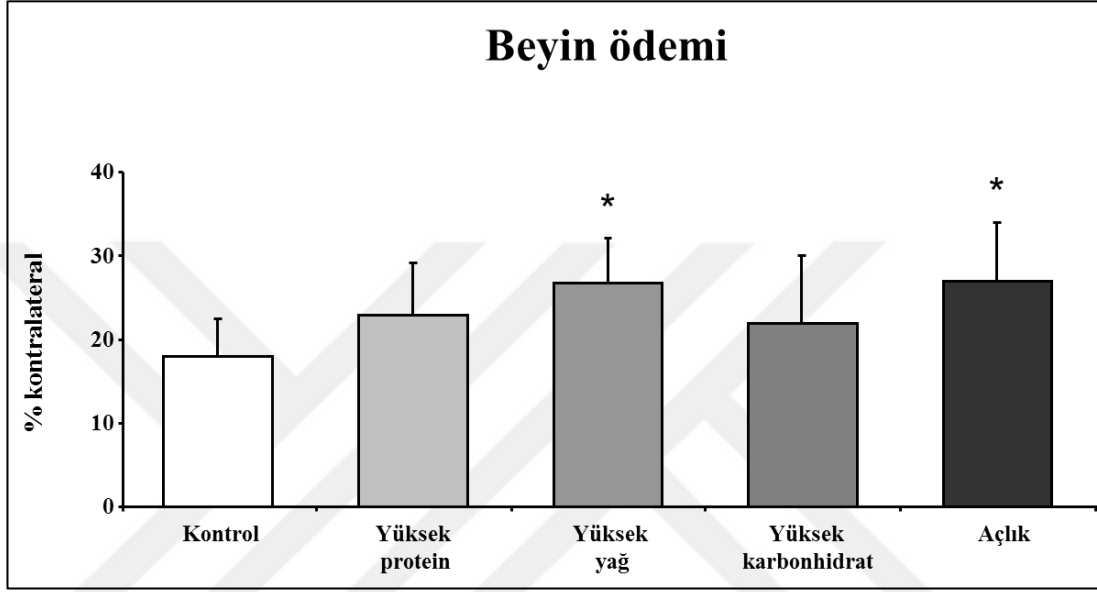


Şekil 6.4.1. 90 dakika iskemi sonrası hasar hacminin *cresyl violet* boyaması yapılarak değerlendirilmesi.

Hasar hacimleri kontrol grubunda $51.9 \pm 6,06 \text{ mm}^3$, yüksek protein grubunda $61.10 \pm 13.28 \text{ mm}^3$, yüksek yağ grubunda $71.74 \pm 12.80 \text{ mm}^3$, yüksek karbonhidrat grubunda $56.58 \pm 19.21 \text{ mm}^3$ ve açlık grubunda $44.90 \pm 10.91 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak P değeri tek-yollu ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır. (** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$, “*” kontrol grubuna göre anlamlılığı, # $p < 0.05$, “#” yüksek protein grubuna göre anlamlılığı ve §§ $p < 0.01$ / § $p < 0.05$, “§” yüksek yağ grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.)

6.5. Beyin Ödemi

90 dakika iskemi setindeki hayvanların birbirine 2.0 mm uzaklıktaki 4 farklı bölgeden alınan beyin kesitleri *cresyl violet* ile boyanan kesitlerden ödem alanları, ipsilateral hemisferin alanından kontralateral hemisferin alanının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır (Şekil 6.5.1).

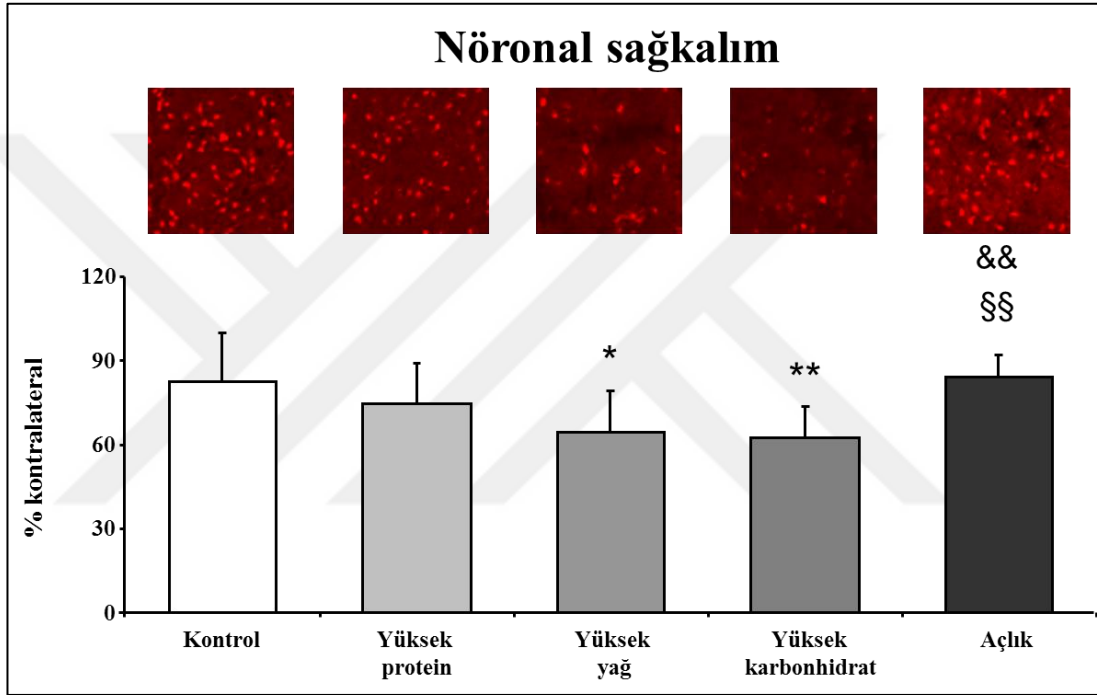


Şekil 6.5.1. 90 dakika iskemi sonrası ödem hacminin *cresyl violet* boyaması yapılarak değerlendirilmesi.

Ödem sonuçları; kontrol grubunda 17.96 ± 4.56 , yüksek protein grubunda 22.89 ± 6.24 , yüksek yağ grubunda 26.70 ± 5.39 , yüksek karbonhidrat grubunda 21.90 ± 8.09 ve açlık grubunda 26.99 ± 7.02 olarak hesaplandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak P değeri tek-yollu ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır. (* $p < 0.05$, “*” kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.)

6.6. Nöronal Sağkalım

Profilaktik olarak farklı diyet tipleri uygulamasının 30 dk iskemi sonrası nöronal sağkalıma etkisinin değerlendirilebilmesi için bu hayvanların striatum seviyesinden alınan beyin kesitleri NeuN antikoru kullanılarak immünofloresan olarak boyanmıştır. Boyama sonrası kesitler konfokal mikroskopta (LSM760, Zeiss) fotoğraflanmış, striatumda belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır (Şekil 6.6.1)

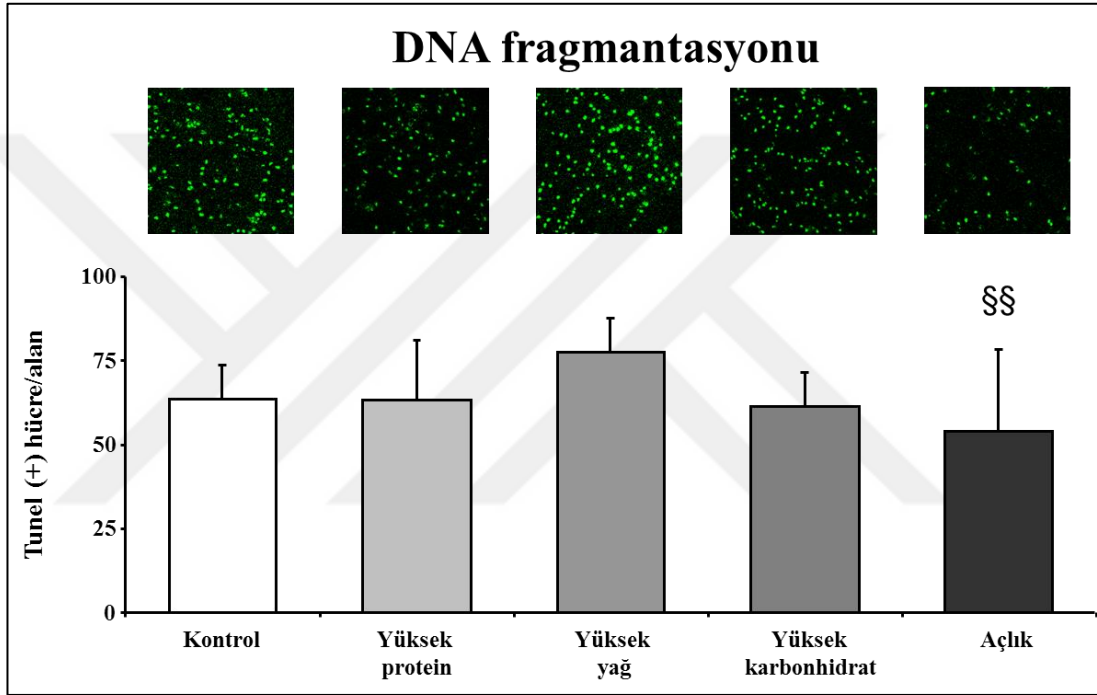


Şekil 6.6.1. Nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.

Hayatta kalan nöron sayıları: kontrol grubunda 82.60 ± 17.34 , yüksek protein grubunda 75.00 ± 14.22 , yüksek yağ grubunda 64.40 ± 14.91 , yüksek karbonhidrat grubunda 66.86 ± 15.80 ve açlık grubunda 84.3 ± 7.90 olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak P değeri tek-yollu ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır. (** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$, “*” kontrol grubuna göre anlamlılığı, §§ $p < 0.01$, “§” yüksek yağ grubuna göre anlamlılığı ve && $p < 0.01$, “&” yüksek karbonhidrat grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.)

6.7. DNA Fragmantasyonu

Profilaktik olarak değişik diyetlerle beslenen ve aç bırakılan hayvanlarda iskemi sonrası meydana gelen hücrenin apoptotik olduğunu ifade eden DNA kırıklarının değerlendirilebilmesi için bu hayvanların beyin kesitleri TUNEL kiti kullanılarak immünofloresan olarak boyanmıştır. Boyama sonrası kesitler konfokal mikroskopta (LSM760, Zeiss) fotoğraflanmış, striatumda belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır (Şekil 6.7.1).



Şekil 6.7.1. Apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi.

Apoptotik hücre sayıları: kontrol grubunda 63.76 ± 9.86 , yüksek protein grubunda 63.24 ± 17.84 , yüksek yağ grubunda 77.24 ± 10.38 , yüksek karbonhidrat grubunda 61.16 ± 10.27 ve açlık grubunda 54.10 ± 24.23 olarak hesaplandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak P değeri tek-yollu ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır. §§ $p < 0.01$, “§” yüksek yağ grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir.

7. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında kısa dönemli diyet kısıtlamasının dünyada ölüm sıralamalarında ilk sıralarda yer alan beyin felci nedeniyle meydana gelen hasar alanı, beyinde oluşan ödem miktarı, nöronal sağkalım ve apoptoz sonucu hücre ölümüne olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, deney hayvanlarında beyin felci hasarı modeli olarak kullanılan Orta Serebral Arter (OSA) tıkanması, insanda beyin felci vakalarının yaklaşık %87'sinden sorumlu olan iskemik beyin felci hasarını en yakın ölçüde tekrarlayan model olması nedeniyle seçilmiştir.

Yapılan tez çalışması süresince 8-12 haftalık erkek BALB/c fareler kullanılmıştır. Beslenmenin beyin felci sonrası hasara etkilerini araştırmak üzere, kontrol grubu standart yem ile beslenirken, diğer gruplara %70 oranında yüksek protein, yağ veya karbonhidrat içeren yemlerden verilmiştir. Açlık grubuna yem verilmemiş, sadece suya ulaşmaları sağlanmıştır. Operasyondan önceki üç gün boyunca buldukları grubun gerektirdiği beslenme düzenine uygun şekilde beslenen hayvanlar, üçüncü günün sonunda operasyona alınmıştır (**Şekil 5.1.1**). Hayvanların diyetle beslenmelerini ve vücut ağırlıklarını takip etmek amacıyla günlük olarak tartımları alınmıştır (**Şekil 6.2.1, 6.2.2**).

Beyin felci modeli olarak kullanılan OSA tıkanmasında 90 ve 30 dakika olmak üzere iki protokol kullanılmıştır. 90 dakika OSA tıkanması modeli kısa süreli diyet kısıtlamasının beyindeki hasar alanı ve ödem miktarına olan etkisini akut olarak incelemek için kullanılmıştır. Bu modelde, orta serebral arter girişi 90 dakika boyunca ucu silikon kaplı bir filament yardımıyla tıkanmıştır. 90 dakika sonunda filament geri çekilerek tekrar kanlanma sağlanmıştır. Bu hasar modelinde, kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin artması sonucu kanda bulunan immün hücreler beyne geçebilmekte ve hasar alanını arttırmaktadır (147). Bu bağlamda membran depolarizasyonlarının bozulmasıyla hücre içine giren Na⁺ iyonlarının da etkisiyle hasar sonrası beyindeki ödem miktarı artmaktadır. Kısa süreli diyet kısıtlamasının beyindeki hasar alanına ve ödeme olan etkisini araştırabilmek adına hasarın ve patofizyolojik süreçlerin tamamlandığı 24 saat sonra hayvanların nörolojik puanlamaları alınmış ve fareler sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların beyinleri alınarak kuru buzda dondurulmuş ve kryostatta (soğuk alan mikrotomu)

birbirine eşit uzaklıktaki dört beyin bölgesinden 18 µm kalınlığında koronal kesitler pozitif yüklü camlara alınmış ve ısıtıcı tablada 40 °C'de lama tesbiti yapılmıştır. Daha sonra bu kesitler histolojik boyamalar için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kısa süreli diyet kısıtlamasının beyinde nöronal sağkalım ve apoptotik süreçlere olan etkisini araştırabilmek için 30 dakika OSA tıkanması modeli kullanılmıştır. Bu modelde OSA girişi 30 dakika boyunca filament yöntemiyle tıkanıp, 30 dakika sonunda tekrar kanlanmayı sağlamak için geri çekilmiştir. Bu hasar modelinde hasar, striatum bölgesiyle sınırlı kalmakta ve genellikle kortekse taşmamaktadır. Apoptotik süreçleri ve nöronal sağ kalımları inceleyebilmek adına, apoptotik süreçlerin tamamlandığı operasyon sonrası 72 saatin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek beyinleri çıkarılmıştır. Daha sonra kuru buzda dondurulan bu beyinler aynı 90 dakika OSA tıkanması modelinde olduğu gibi kryostatta 18 µm kalınlığında koronal olarak kesilmiştir. Bu modelde hasar striatum bölgesiyle sınırlı kaldığından kesitler sadece striatum bölgesinden alınmıştır. Daha sonra histolojik ve floresan boyamalar için kullanılacak olan bu kesitler -20 °C'de saklanmıştır.

Uygulanan OSA tıkanması modelinin tekrar edilebilirliğini ve iskemi süresinin 90 ve 30 dakika ile sınırlandırıldığını göstermek için deneyde kullanılan hayvanların beyin kan akımları LDF sistemiyle kontrol edilmiştir. LDF sistemiyle her ne kadar bölgesel kan akımı mutlak şekilde ölçülemese de, kan akımında meydana gelen anlık değişimler incelenebilmektedir (148, 149).

Yaptığımız çalışmada, OSA tıkanması modelinde operasyondan önce üç gün boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen grupta, hem 90 hem de 30 dakika iskemi sonrasında diğer gruplara oranla hipoperfüzyon gözlenmiştir (**Şekil 6.1.1, 6.1.2**).

Hasar hacmi tayini 90 dakika iskemi ardından 24 saat reperfüzyon modelinde yapılmıştır. Operasyon sonrası çıkarılıp, kuru buzda dondurulan beyinler kryostatta 18 µm kalınlığında, birbirlerine eş 4 bölgeden kesildikten sonra, hasar alanı tayini için *cresyl violet* boyaması protokolü uygulanmıştır. Bu boyama hücrede granüllü endoplazmik retikulum (GER) üzerinde bulunan nissl cisimciklerinin tayininde kullanılmaktadır. Yaşayan hücrelerde GER aktif halde iken *cresyl violet* boyamasıyla mavi-mor renk verirken, hücre öldüğünde protein sentezinin durmasıyla *cresyl violet*

boyaması sonucu bir renk değişimi gözlenememektedir (149). 18 µm kalınlığında, beyinden 2 mm eş aralıklarla (bregma -2.0, 0.0, +2.0 ve +4.0) alınan kesitlere *cresyl violet* prosedürü uygulanmış ve tarayıcıda taratılan kesitlerden, ImageJ programı yardımıyla her beynin dört bölgesinden yapılan ölçümler sonucu hasar hacmi analizi yapılmıştır.

90 dakika iskemi ardından 24 saat reperfüzyon modelinde hasar hacmi tayinlerine bakıldığında yüksek yağ grubunun hasar hacmi kontrol grubuna oranla tek-yönlü ANOVA testinde istatistiksel olarak artış göstermiştir (** $p<0.01$). Diğer yandan yüksek karbonhidrat ($^{\$}p<0.05$) ve açlık grubu ($^{§§}p<0.01$) yüksek yağlı gruba oranla istatistiksel olarak anlamlıdır (**Şekil 6.4.1**). Yapılan araştırmalarda uzun dönem yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, beyin bölgelerinden hipotalamusta enflamasyonun arttığı belirtilmiştir (150, 151). Ek olarak yüksek yağlı diyet sonucu hipotalamik nöronlarda endoplazmik retikulum stresi ve apoptozun indüklendiği ve bu bölgedeki nörogenezin inhibe edildiği gösterilmiştir (152, 153). Ayrıca sıçanların yüksek yağlı diyetle beslenmeye başladıktan 3 gün sonra hipotalamuslarında artmış astrosit ve microglia aktivasyonları gözlenmiştir (152). Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmada yüksek yağlı diyet grubunda hasar hacminin o bölgede bulunan enflamatuvar cevabın artması nedeniyle artış gösterdiği düşünülmektedir.

Kısa dönemli besin kısıtlaması sonrası beyinde meydana gelen ödem miktarı yine 90 dakika iskemi ardından 24 saat reperfüzyon modelinde incelenmiştir. 18 µm kalınlığında kryostatta kesilen ve beyinde eş 2 mm (bregma -2.0, 0.0, +2.0 ve +4.0) uzaklıktaki bölgelerden alınan kesitler *cresyl violet* boyaması yapıldıktan sonra, tarayıcıda taranmış ve sonrasında ImageJ programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Her beynin dört bölgesinden yapılan ölçümler sonucu ödem analizi yapılmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında yüksek yağlı diyet ($^*p<0.05$) ve açlık ($^*p<0.05$) gruplarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak yüksek bir ödem miktarı gözlenmiştir (**Şekil 6.5.1**). Obezite sonucu oksidatif stres ve immun cevabın arttığı bilinmektedir (154, 155). Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmada yağ grubunda oluşan ödemin, kontrol grubuna oranla yüksek olmasının nedeninin, beyinde artan oksidatif stres ile birlikte kan beyin bariyeri geçirgenliğinin artması sonucu beyinde ödem artışının izlenmesi olarak düşünülmektedir. Açlık grubunda

ise, açlık sonucu plazma proteinlerinin yeterli miktarda üretilememesi nedeniyle ve enerji eksikliğine bağlı olarak beyindeki ödemin artış gösterdiği düşünülmektedir.

Nöronal sağkalımın araştırılabilmesi için koronal kesitleri alınmış beyinlere nöronal çekirdek proteinine (NeuN) karşı immünohistolojik boyama yapılmıştır. Bu prosedürde NeuN antikoru nöron hücrelerinin çekirdeklerindeki NeuN antijeniyle reaksiyona girmektedir. Floresan moleküle konjüge sekonder antikor ile lazerle uyarım sonucu nöronların çekirdekleri boyanmaktadır (156). Nöronal sağkalım analizi 30 dakika iskemi modeline uygulanmıştır. Striatumda seçilen bölgelerden yapılan sayımlar sonucu nöronal sağkalım değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmada yüksek yağ ve yüksek karbonhidrat gruplarındaki hücresel sağkalım kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak azalmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Ek olarak, açlık grubundaki hücresel sağkalım yüksek yağ ve yüksek karbonhidrat gruplarına oranla istatistiksel olarak artmıştır (yüksek yağa göre, §§ $p < 0.01$; yüksek karbonhidrata göre, && $p < 0.01$). Açlık grubunda kontrol grubuna oranla hücresel sağ kalımda istatistiksel olarak bir artış görülmemiştir (**Şekil 6.6.1**).

Yüksek yağlı diyetin hipotalamus bölgesinde enflamasyonu ve apoptozu arttırdığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (150-153). Yaptığımız çalışmada, literatürle benzer olarak yüksek yağ ile beslenen grupta, kontrol grubuna kıyasla hücresel sağ kalımda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Yüksek karbonhidratla beslenen gruba bakıldığında ise, ortamda yeterli miktarda glikozun bulunmasına karşın, iskemi nedeniyle oksijen eksikliği sonucu oksidatif fosforilasyonun baskılanıp glikozun laktata dönüşümü indüklenmektedir. Ortamda meydana gelen laktat birikimiyle birlikte asidozun artması sonucu bu grupta hücresel sağkalımın azaldığı düşünülmektedir (157).

Yapılan çalışmada kısa süreli diyet değişikliği sonucu beyinde meydana gelen apoptotik süreçleri araştırmak amacıyla 30 dakika iskemi ardından 72 saat reperfüzyon modelinde TUNEL analizi gerçekleştirilmiştir. TUNEL analizinde, apoptoz sonucu oluşan DNA kırıklarına, TUNEL setinin içeriğinde bulunan, floresan moleküle işaretlenmiş d-UTP'ler bağlanmakta ve floresan mikroskop altında ilgili

dalga boyunda ışıkla uyarıldığında ışımaya vermektedir. Böylece, DNA kırıklarının işaretlenmesinden yararlanılarak apoptoz hakkında analiz yapılabilmektedir (147).

Yapılan bu tez çalışmasında, açlık grubundaki TUNEL pozitif hücre oranının, yüksek yağlı gruptakine oranla istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p < 0.01$). Kontrol grubuna oranla herhangi bir diyet grubunda istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir (Şekil 6.7.1). Yüksek yağlı diyetin hipotalamus bölgesinde enflamasyonu ve apoptozu arttırdığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (150-153). Bu bağlamda yaptığımız çalışmada literatürle benzer olarak, yüksek yağlı grupta artmış apoptotik aktivite görülmektedir. Ancak bu artış anlamlılığı sağlayacak değerde bulunmamaktadır.



8. SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasında, farklı diyet kısıtlamalarının beyin felcinde; hasar alanı, ödem, nöronal sağkalım ve apoptoz süreçlerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda değişik diyet kısıtlamalarının, oluşan patofizyolojik koşulları etkilediği, hatta daha kötüye götürebildiği gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda, karşılaşılabilecek patofizyolojik koşulların riskini azalmak ve oluşan koşulların daha kötüye gitmesini engellemek adına diyet kısıtlamasının geleceğe dönük sağlık planlamalarında önemli bir araç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.



9. Kaynaklar

1. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397. doi: 1999.
2. Benjamin, EJ, Blaha, MJ, Chiuve, SE, Cushman, M, Das, SR, Deo, R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485, 2017.
3. Adams, HP, Jr., del Zoppo, G, Alberts, MJ, Bhatt, DL, Brass, L, Furlan, A, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* **38**, 1655-1711. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.181486, 2007.
4. Group, AS, Cushman, WC, Evans, GW, Byington, RP, Goff, DC, Jr., Grimm, RH, Jr., et al. Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **362**, 1575-1585. doi: 10.1056/NEJMoa1001286, 2010.
5. Martin, RL, Lloyd, HG, and Cowan, AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251-257. doi: 1994.
6. Katsura, K, Kristian, T, and Siesjo, BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* **22**, 991-996. doi: 1994.
7. Park, CK, Nehls, DG, Teasdale, GM, and McCulloch, J. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 617-622. doi: 10.1038/jcbfm.1989.88, 1989.
8. Furukawa, K, Fu, W, Li, Y, Witke, W, Kwiatkowski, DJ, and Mattson, MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA

- receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* **17**, 8178-8186. doi: 1997.
9. Chen, ZL, and Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* **91**, 917-925. doi: 1997.
 10. Zhao, Q, Pahlmark, K, Smith, ML, and Siesjo, BK. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand* **152**, 349-350. doi: 10.1111/j.1748-1716.1994.tb09816.x, 1994.
 11. Yang, G, Chan, PH, Chen, J, Carlson, E, Chen, SF, Weinstein, P, et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* **25**, 165-170. doi: 1994.
 12. Weisbrot-Lefkowitz, M, Reuhl, K, Perry, B, Chan, PH, Inouye, M, and Mirochnitchenko, O. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* **53**, 333-338. doi: 1998.
 13. Kondo, T, Reaume, AG, Huang, TT, Carlson, E, Murakami, K, Chen, SF, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **17**, 4180-4189. doi: 1997.
 14. Murakami, K, Kondo, T, Kawase, M, Li, Y, Sato, S, Chen, SF, et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* **18**, 205-213. doi: 1998.
 15. Choi, DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* **23**, 1261-1276. doi: 10.1002/neu.480230915, 1992.
 16. Dugan, LL, and Choi, DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol* **35 Suppl**, S17-21. doi: 1994.
 17. Westrate, LM, Drocco, JA, Martin, KR, Hlavacek, WS, and MacKeigan, JP. Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PLoS One* **9**, e95265. doi: 10.1371/journal.pone.0095265, 2014.

18. Roy, MJ, Vom, A, Czabotar, PE, and Lessene, G. Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol* **171**, 1973-1987. doi: 10.1111/bph.12431, 2014.
19. Javadov, S, and Kuznetsov, A. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d. *Front Physiol* **4**, 76. doi: 10.3389/fphys.2013.00076, 2013.
20. Mousa, SA. Adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications. *Methods Mol Biol* **663**, 261-276. doi: 10.1007/978-1-60761-803-4_11, 2010.
21. Chen, BS, and Wu, SN. Functional role of the activity of ATP-sensitive potassium channels in electrical behavior of hippocampal neurons: experimental and theoretical studies. *J Theor Biol* **272**, 16-25. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.12.003, 2011.
22. Diwan, A, Krenz, M, Syed, FM, Wansapura, J, Ren, X, Koesters, AG, et al. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest* **117**, 2825-2833. doi: 10.1172/JCI32490, 2007.
23. Hochhauser, E, Kivity, S, Offen, D, Maulik, N, Otani, H, Barhum, Y, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H2351-2359. doi: 10.1152/ajpheart.00783.2002, 2003.
24. Hurley, SD, Olschowka, JA, and O'Banion, MK. Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *J Neurotrauma* **19**, 1-15. doi: 10.1089/089771502753460196, 2002.
25. Minghetti, L. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases. *Subcell Biochem* **42**, 127-141. doi: 2007.
26. Garcia-Bonilla, L, Moore, JM, Racchumi, G, Zhou, P, Butler, JM, Iadecola, C, et al. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *J Immunol* **193**, 2531-2537. doi: 10.4049/jimmunol.1400918, 2014.

27. Hall, CN, Reynell, C, Gesslein, B, Hamilton, NB, Mishra, A, Sutherland, BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60. doi: 10.1038/nature13165, 2014.
28. Huang, J, Choudhri, TF, Winfree, CJ, McTaggart, RA, Kiss, S, Mocco, J, et al. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke* **31**, 3047-3053. doi: 2000.
29. Iadecola, C, and Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* **17**, 796-808. doi: 10.1038/nm.2399, 2011.
30. Allan, SM, and Rothwell, NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 734-744. doi: 10.1038/35094583, 2001.
31. Burnstock, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 575-590. doi: 10.1038/nrd2605, 2008.
32. Shichita, T, Sugiyama, Y, Ooboshi, H, Sugimori, H, Nakagawa, R, Takada, I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* **15**, 946-950. doi: 10.1038/nm.1999, 2009.
33. Starossom, SC, Mascanfroni, ID, Imitola, J, Cao, L, Raddassi, K, Hernandez, SF, et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity* **37**, 249-263. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.023, 2012.
34. Kawanokuchi, J, Shimizu, K, Nitta, A, Yamada, K, Mizuno, T, Takeuchi, H, et al. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol* **194**, 54-61. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.11.006, 2008.
35. Morrison, HW, and Filosa, JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation* **10**, 4. doi: 10.1186/1742-2094-10-4, 2013.
36. Taylor, RA, and Sansing, LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol* **2013**, 746068. doi: 10.1155/2013/746068, 2013.
37. Denes, A, Vidyasagar, R, Feng, J, Narvainen, J, McColl, BW, Kauppinen, RA, et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in

- mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1941-1953. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600495, 2007.
38. Villarreal, A, Rosciszewski, G, Murta, V, Cadena, V, Usach, V, Dodes-Traian, MM, et al. Isolation and Characterization of Ischemia-Derived Astrocytes (IDAs) with Ability to Transactivate Quiescent Astrocytes. *Front Cell Neurosci* **10**, 139. doi: 10.3389/fncel.2016.00139, 2016.
 39. Mattson, MP. Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol* **10**, 300-312. doi: 2000.
 40. Xu, L, Yenari, MA, Steinberg, GK, and Giffard, RG. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 21-28. doi: 10.1097/00004647-200201000-00003, 2002.
 41. Won, SJ, Kim, DY, and Gwag, BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* **35**, 67-86. doi: 2002.
 42. Hertz, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* **55**, 289-309. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023, 2008.
 43. Rossi, DJ, Brady, JD, and Mohr, C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* **10**, 1377-1386. doi: 10.1038/nn2004, 2007.
 44. Kaplan, JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* **71**, 511-535. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218, 2002.
 45. Boya, P, Reggiori, F, and Codogno, P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* **15**, 713-720. doi: 10.1038/ncb2788, 2013.
 46. Galluzzi, L, Pietrocola, F, Levine, B, and Kroemer, G. Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**, 1263-1276. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.006, 2014.
 47. Gallagher, LE, Williamson, LE, and Chan, EY. Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells* **5**doi: 10.3390/cells5020024, 2016.
 48. Nikolettou, V, Papandreou, ME, and Tavernarakis, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ* **22**, 398-407. doi: 10.1038/cdd.2014.204, 2015.

49. Liang, K, Zhu, L, Tan, J, Shi, W, He, Q, and Yu, B. Identification of autophagy signaling network that contributes to stroke in the ischemic rodent brain via gene expression. *Neurosci Bull* **31**, 480-490. doi: 10.1007/s12264-015-1547-3, 2015.
50. Martinet, W, Timmermans, JP, and De Meyer, GR. Methods to assess autophagy in situ--transmission electron microscopy versus immunohistochemistry. *Methods Enzymol* **543**, 89-114. doi: 10.1016/B978-0-12-801329-8.00005-2, 2014.
51. Liu, C, Gao, Y, Barrett, J, and Hu, B. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem* **115**, 68-78. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06905.x, 2010.
52. Chen, W, Sun, Y, Liu, K, and Sun, X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen Res* **9**, 1210-1216. doi: 10.4103/1673-5374.135329, 2014.
53. Chen, XM, Chen, HS, Xu, MJ, and Shen, JG. Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 67-77. doi: 10.1038/aps.2012.82, 2013.
54. Lu, Q, Harris, VA, Kumar, S, Mansour, HM, and Black, SM. Autophagy in neonatal hypoxia ischemic brain is associated with oxidative stress. *Redox Biol* **6**, 516-523. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.016, 2015.
55. Scherz-Shouval, R, and Elazar, Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* **36**, 30-38. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.007, 2011.
56. Albers, GW, Amarenco, P, Easton, JD, Sacco, RL, and Teal, P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* **133**, 630S-669S. doi: 10.1378/chest.08-0720, 2008.
57. Lijnen, HR, and Collen, D. Tissue-type plasminogen activator. *Ann Biol Clin (Paris)* **45**, 198-201. doi: 1987.
58. Hacke, W, Kaste, M, Bluhmki, E, Brozman, M, Davalos, A, Guidetti, D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-1329. doi: 10.1056/NEJMoa0804656, 2008.

59. Clark, WM, Wissman, S, Albers, GW, Jhamandas, JH, Madden, KP, and Hamilton, S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* **282**, 2019-2026. doi: 1999.
60. Kilic, E, Bahr, M, and Hermann, DM. Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations. *Stroke* **32**, 2641-2647. doi: 2001.
61. Bargonetti, J, and Manfredi, JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* **14**, 86-91. doi: 2002.
62. Choi, KE, Hall, CL, Sun, JM, Wei, L, Mohamad, O, Dix, TA, et al. A novel stroke therapy of pharmacologically induced hypothermia after focal cerebral ischemia in mice. *FASEB J* **26**, 2799-2810. doi: 10.1096/fj.11-201822, 2012.
63. Lee, JH, Wei, L, Gu, X, Wei, Z, Dix, TA, and Yu, SP. Therapeutic effects of pharmacologically induced hypothermia against traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **31**, 1417-1430. doi: 10.1089/neu.2013.3251, 2014.
64. Prakasa Babu, P, Yoshida, Y, Su, M, Segura, M, Kawamura, S, and Yasui, N. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bax and cytochrome c following focal cerebral ischemia and effect of hypothermia in rat. *Neurosci Lett* **291**, 196-200. doi: 2000.
65. Zhao, H, Yenari, MA, Sapolsky, RM, and Steinberg, GK. Mild postischemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke* **35**, 572-577. doi: 10.1161/01.STR.0000110787.42083.58, 2004.
66. Siesjo, BK, Bengtsson, F, Grampp, W, and Theander, S. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann N Y Acad Sci* **568**, 234-251. doi: 1989.
67. Hall, ED. Brain attack. Acute therapeutic interventions. Free radical scavengers and antioxidants. *Neurosurg Clin N Am* **8**, 195-206. doi: 1997.

68. O'Collins, VE, Macleod, MR, Donnan, GA, Horkey, LL, van der Worp, BH, and Howells, DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* **59**, 467-477. doi: 10.1002/ana.20741, 2006.
69. Fluri, F, Schuhmann, MK, and Kleinschnitz, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* **9**, 3445-3454. doi: 10.2147/DDDT.S56071, 2015.
70. Stankowski, JN, and Gupta, R. Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxid Redox Signal* **14**, 1841-1851. doi: 10.1089/ars.2010.3292, 2011.
71. Ehrenreich, H, Hasselblatt, M, Dembowski, C, Cepek, L, Lewczuk, P, Stiefel, M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **8**, 495-505. doi: 2002.
72. Ehrenreich, H, Weissenborn, K, Prange, H, Schneider, D, Weimar, C, Wartenberg, K, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* **40**, e647-656. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.564872, 2009.
73. Muir, KW. Magnesium for neuroprotection in ischaemic stroke: rationale for use and evidence of effectiveness. *CNS Drugs* **15**, 921-930. doi: 2001.
74. Wong, GK, Poon, WS, Chan, MT, Boet, R, Gin, T, Ng, SC, et al. Plasma magnesium concentrations and clinical outcomes in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients: post hoc analysis of intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage trial. *Stroke* **41**, 1841-1844. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.585232, 2010.
75. Dorhout Mees, SM, Algra, A, Vandertop, WP, van Kooten, F, Kuijsten, HA, Boiten, J, et al. Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **380**, 44-49. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60724-7, 2012.
76. van den Bergh, WM, Algra, A, van der Sprenkel, JW, Tulleken, CA, and Rinkel, GJ. Hypomagnesemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **52**, 276-281; discussion 281-272. doi: 2003.
77. Westermaier, T, Stetter, C, Vince, GH, Pham, M, Tejon, JP, Eriskat, J, et al. Prophylactic intravenous magnesium sulfate for treatment of aneurysmal

- subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, clinical study. *Crit Care Med* **38**, 1284-1290. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181d9da1e, 2010.
78. McCay, CM, Crowell, MF, and Maynard, LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* **5**, 155-171; discussion 172. doi: 1989.
79. Yu, BP, Masoro, EJ, and McMahan, CA. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol* **40**, 657-670. doi: 1985.
80. Weindruch, R, and Walford, RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* **215**, 1415-1418. doi: 1982.
81. Pugh, TD, Oberley, TD, and Weindruch, R. Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice. *Cancer Res* **59**, 1642-1648. doi: 1999.
82. Berrigan, D, Perkins, SN, Haines, DC, and Hursting, SD. Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* **23**, 817-822. doi: 2002.
83. Jung, KJ, Lee, EK, Kim, JY, Zou, Y, Sung, B, Heo, HS, et al. Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF-kB and AP-1 in aged rat kidney. *Inflamm Res* **58**, 143-150. doi: 10.1007/s00011-008-7227-2, 2009.
84. Dai, DF, Karunadharma, PP, Chiao, YA, Basisty, N, Crispin, D, Hsieh, EJ, et al. Altered proteome turnover and remodeling by short-term caloric restriction or rapamycin rejuvenate the aging heart. *Aging Cell* **13**, 529-539. doi: 10.1111/accel.12203, 2014.
85. Geng, YQ, Guan, JT, Xu, MY, Xu, XH, and Fu, YC. Behavioral study of calorie-restricted rats from early old age. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2007**, 2393-2395. doi: 10.1109/IEMBS.2007.4352809, 2007.
86. Singh, R, Lakhanpal, D, Kumar, S, Sharma, S, Kataria, H, Kaur, M, et al. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *Age (Dordr)* **34**, 917-933. doi: 10.1007/s11357-011-9289-2, 2012.

87. Li, L, Wang, Z, and Zuo, Z. Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. *PLoS One* **8**, e66069. doi: 10.1371/journal.pone.0066069, 2013.
88. Kuhla, A, Lange, S, Holzmann, C, Maass, F, Petersen, J, Vollmar, B, et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PLoS One* **8**, e68778. doi: 10.1371/journal.pone.0068778, 2013.
89. Alomari, MA, Khabour, OF, Alzoubi, KH, and Alzubi, MA. Combining restricted diet with forced or voluntary exercises improves hippocampal BDNF and cognitive function in rats. *Int J Neurosci* **126**, 366-373. doi: 10.3109/00207454.2015.1012587, 2016.
90. Khabour, OF, Alzoubi, KH, Alomari, MA, and Alzubi, MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus* **20**, 637-645. doi: 10.1002/hipo.20657, 2010.
91. Hansalik, M, Skalicky, M, and Viidik, A. Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Exp Gerontol* **41**, 169-174. doi: 10.1016/j.exger.2005.11.002, 2006.
92. Harrison, DE, and Archer, JR. Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. *J Nutr* **117**, 376-382. doi: 1987.
93. Reiser, K, McGee, C, Rucker, R, and McDonald, R. Effects of aging and caloric restriction on extracellular matrix biosynthesis in a model of injury repair in rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50A**, B40-47. doi: 1995.
94. Hsieh, EA, Chai, CM, and Hellerstein, MK. Effects of caloric restriction on cell proliferation in several tissues in mice: role of intermittent feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E965-972. doi: 10.1152/ajpendo.00368.2004, 2005.
95. Spanheimer, R, Zlatev, T, Umpierrez, G, and DiGirolamo, M. Collagen production in fasted and food-restricted rats: response to duration and severity of food deprivation. *J Nutr* **121**, 518-524. doi: 1991.

96. Otranto, M, Souza-Netto, I, Aguila, MB, and Monte-Alto-Costa, A. Male and female rats with severe protein restriction present delayed wound healing. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 1023-1031. doi: 10.1139/H09-100, 2009.
97. Emery, PW, and Sanderson, P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. *Clin Sci (Lond)* **89**, 383-388. doi: 1995.
98. Hayati, F, Maleki, M, Pourmohammad, M, Sardari, K, Mohri, M, and Afkhami, A. Influence of Short-term, Repeated Fasting on the Skin Wound Healing of Female Mice. *Wounds* **23**, 38-43. doi: 2011.
99. Wan, R, Camandola, S, and Mattson, MP. Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats. *FASEB J* **17**, 1133-1134. doi: 10.1096/fj.02-0996fje, 2003.
100. Mager, DE, Wan, R, Brown, M, Cheng, A, Wareski, P, Abernethy, DR, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J* **20**, 631-637. doi: 10.1096/fj.05-5263com, 2006.
101. Vadiveloo, M, Scott, M, Quatromoni, P, Jacques, P, and Parekh, N. Trends in dietary fat and high-fat food intakes from 1991 to 2008 in the Framingham Heart Study participants. *Br J Nutr* **111**, 724-734. doi: 10.1017/S0007114513002924, 2014.
102. Fraulob, JC, Ogg-Diamantino, R, Fernandes-Santos, C, Aguila, MB, and Mandarim-de-Lacerda, CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* **46**, 212-223. doi: 10.3164/jcbrn.09-83, 2010.
103. Gallou-Kabani, C, Vige, A, Gross, MS, Rabes, JP, Boileau, C, Larue-Achagiotis, C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 1996-2005. doi: 10.1038/oby.2007.238, 2007.

104. Buettner, R, Scholmerich, J, and Bollheimer, LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 798-808. doi: 10.1038/oby.2007.608, 2007.
105. Winzell, MS, and Ahren, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S215-219. doi: 2004.
106. Cordner, ZA, and Tamashiro, KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* **152**, 363-371. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.008, 2015.
107. Kurhe, Y, and Mahesh, R. Ondansetron attenuates co-morbid depression and anxiety associated with obesity by inhibiting the biochemical alterations and improving serotonergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* **136**, 107-116. doi: 10.1016/j.pbb.2015.07.004, 2015.
108. Kurhe, Y, Radhakrishnan, M, and Gupta, D. Ondansetron attenuates depression co-morbid with obesity in obese mice subjected to chronic unpredictable mild stress; an approach using behavioral battery tests. *Metab Brain Dis* **29**, 701-710. doi: 10.1007/s11011-014-9574-8, 2014.
109. Kurhe, Y, Mahesh, R, and Gupta, D. Effect of a selective cyclooxygenase type 2 inhibitor celecoxib on depression associated with obesity in mice: an approach using behavioral tests. *Neurochem Res* **39**, 1395-1402. doi: 10.1007/s11064-014-1322-2, 2014.
110. Sharma, S, and Fulton, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* **37**, 382-389. doi: 10.1038/ijo.2012.48, 2013.
111. Zemdegs, J, Quesseveur, G, Jarriault, D, Penicaud, L, Fioramonti, X, and Guiard, BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol* **173**, 2095-2110. doi: 10.1111/bph.13343, 2016.
112. Sivanathan, S, Thavartnam, K, Arif, S, Elegino, T, and McGowan, PO. Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus

- of female rats. *Behav Brain Res* **286**, 265-270. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.036, 2015.
113. Kang, SS, Jeraldo, PR, Kurti, A, Miller, ME, Cook, MD, Whitlock, K, et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener* **9**, 36. doi: 10.1186/1750-1326-9-36, 2014.
114. Andre, C, Dinel, AL, Ferreira, G, Laye, S, and Castanon, N. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun* **41**, 10-21. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.012, 2014.
115. Knight, EM, Martins, IV, Gumusgoz, S, Allan, SM, and Lawrence, CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging* **35**, 1821-1832. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.010, 2014.
116. Freeman, LR, Haley-Zitlin, V, Stevens, C, and Granholm, AC. Diet-induced effects on neuronal and glial elements in the middle-aged rat hippocampus. *Nutr Neurosci* **14**, 32-44. doi: 10.1179/174313211X12966635733358, 2011.
117. Sobesky, JL, Barrientos, RM, De May, HS, Thompson, BM, Weber, MD, Watkins, LR, et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1beta, an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav Immun* **42**, 22-32. doi: 10.1016/j.bbi.2014.06.017, 2014.
118. Boitard, C, Cavaroc, A, Sauvart, J, Aubert, A, Castanon, N, Laye, S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* **40**, 9-17. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.005, 2014.
119. Lynch, CM, Kinzenbaw, DA, Chen, X, Zhan, S, Mezzetti, E, Filosa, J, et al. Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced obesity. *Stroke* **44**, 3195-3201. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001366, 2013.

120. Li, W, Prakash, R, Chawla, D, Du, W, Didion, SP, Filosa, JA, et al. Early effects of high-fat diet on neurovascular function and focal ischemic brain injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R1001-1008. doi: 10.1152/ajpregu.00523.2012, 2013.
121. Kawai, HD, La, M, Kang, HA, Hashimoto, Y, Liang, K, Lazar, R, et al. Convergence of nicotine-induced and auditory-evoked neural activity activates ERK in auditory cortex. *Synapse* **67**, 455-468. doi: 10.1002/syn.21647, 2013.
122. Della-Pace, ID, Rambo, LM, Ribeiro, LR, Saraiva, AL, de Oliveira, SM, Silva, CR, et al. Triterpene 3beta, 6beta, 16beta trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: the role of Na(+),K(+)-ATPase activity. *Neuropharmacology* **67**, 455-464. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.10.022, 2013.
123. Raymond, F, Wang, L, Moser, M, Metairon, S, Mansourian, R, Zwahlen, MC, et al. Consequences of exchanging carbohydrates for proteins in the cholesterol metabolism of mice fed a high-fat diet. *PLoS One* **7**, e49058. doi: 10.1371/journal.pone.0049058, 2012.
124. Xiao, F, Huang, Z, Li, H, Yu, J, Wang, C, Chen, S, et al. Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* **60**, 746-756. doi: 10.2337/db10-1246, 2011.
125. Rietman, A, Schwarz, J, Tome, D, Kok, FJ, and Mensink, M. High dietary protein intake, reducing or eliciting insulin resistance? *Eur J Clin Nutr* **68**, 973-979. doi: 10.1038/ejcn.2014.123, 2014.
126. Gredilla, R, and Barja, G. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* **146**, 3713-3717. doi: 10.1210/en.2005-0378, 2005.
127. Sanz, A, Caro, P, Ibanez, J, Gomez, J, Gredilla, R, and Barja, G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 83-90. doi: 10.1007/s10863-005-4131-0, 2005.

128. Bevilacqua, L, Ramsey, JJ, Hagopian, K, Weindruch, R, and Harper, ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E429-438. doi: 10.1152/ajpendo.00435.2004, 2005.
129. Arumugam, TV, Phillips, TM, Cheng, A, Morrell, CH, Mattson, MP, and Wan, R. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann Neurol* **67**, 41-52. doi: 10.1002/ana.21798, 2010.
130. Yu, ZF, and Mattson, MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* **57**, 830-839. doi: 1999.
131. Anson, RM, Guo, Z, de Cabo, R, Iyun, T, Rios, M, Hagepanos, A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6216-6220. doi: 10.1073/pnas.1035720100, 2003.
132. Duan, W, Lee, J, Guo, Z, and Mattson, MP. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* **16**, 1-12. doi: 10.1385/JMN:16:1:1, 2001.
133. Duan, W, Guo, Z, and Mattson, MP. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem* **76**, 619-626. doi: 2001.
134. Lee, J, Duan, W, and Mattson, MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* **82**, 1367-1375. doi: 2002.
135. Lee, J, Duan, W, Long, JM, Ingram, DK, and Mattson, MP. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* **15**, 99-108. doi: 10.1385/JMN:15:2:99, 2000.

136. Ferrer, I, Krupinski, J, Goutan, E, Marti, E, Ambrosio, S, and Arenas, E. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol* **101**, 229-238. doi: 2001.
137. Schabitz, WR, Schwab, S, Spranger, M, and Hacke, W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 500-506. doi: 10.1097/00004647-199705000-00003, 1997.
138. Ahmet, I, Wan, R, Mattson, MP, Lakatta, EG, and Talan, M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* **112**, 3115-3121. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563817, 2005.
139. Chandrasekar, B, Nelson, JF, Colston, JT, and Freeman, GL. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2094-2102. doi: 2001.
140. Mitchell, JR, Verweij, M, Brand, K, van de Ven, M, Goemaere, N, van den Engel, S, et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* **9**, 40-53. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00532.x, 2010.
141. Peng, W, Robertson, L, Gallinetti, J, Mejia, P, Vose, S, Charlip, A, et al. Surgical stress resistance induced by single amino acid deprivation requires Gcn2 in mice. *Sci Transl Med* **4**, 118ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3002629, 2012.
142. Kirsch, JR, and D'Alecy, LG. Effect of altered availability of energy-yielding substrates upon survival from hypoxia in mice. *Stroke* **10**, 288-291. doi: 1979.
143. Rehncrona, S, Rosen, I, and Smith, ML. Effect of different degrees of brain ischemia and tissue lactic acidosis on the short-term recovery of neurophysiologic and metabolic variables. *Exp Neurol* **87**, 458-473. doi: 1985.
144. Combs, DJ, and D'Alecy, LG. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke* **18**, 503-511. doi: 1987.

145. Go, KG, Prenen, GH, and Korf, J. Protective effect of fasting upon cerebral hypoxic-ischemic injury. *Metab Brain Dis* **3**, 257-263. doi: 1988.
146. Marie, C, Bralet, AM, Gueldry, S, and Bralet, J. Fasting prior to transient cerebral ischemia reduces delayed neuronal necrosis. *Metab Brain Dis* **5**, 65-75. doi: 1990.
147. Beker, MC, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604-30614. doi: 10.18632/oncotarget.5773, 2015.
148. Doeppner, TR, Traut, V, Heidenreich, A, Kaltwasser, B, Bosche, B, Bahr, M, et al. Conditioned Medium Derived from Neural Progenitor Cells Induces Long-term Post-ischemic Neuroprotection, Sustained Neurological Recovery, Neurogenesis, and Angiogenesis. *Mol Neurobiol* **54**, 1531-1540. doi: 10.1007/s12035-016-9748-y, 2017.
149. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Kelestemur, T, 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* **8**, 422. doi: 10.3389/fncel.2014.00422, 2014.
150. Milanski, M, Degasperi, G, Coope, A, Morari, J, Denis, R, Cintra, DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* **29**, 359-370. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009, 2009.
151. Zhang, X, Zhang, G, Zhang, H, Karin, M, Bai, H, and Cai, D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **135**, 61-73. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.043, 2008.
152. Thaler, JP, Yi, CX, Schur, EA, Guyenet, SJ, Hwang, BH, Dietrich, MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* **122**, 153-162. doi: 10.1172/JCI59660, 2012.

153. McNay, DE, Briancon, N, Kokoeva, MV, Maratos-Flier, E, and Flier, JS. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* **122**, 142-152. doi: 10.1172/JCI43134, 2012.
154. Wang, H, Li, J, Gai, Z, Kullak-Ublick, GA, and Liu, Z. TNF-alpha Deficiency Prevents Renal Inflammation and Oxidative Stress in Obese Mice. *Kidney Blood Press Res* **42**, 416-427. doi: 10.1159/000478869, 2017.
155. Pedersen, BK, and Febbraio, MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 457-465. doi: 10.1038/nrendo.2012.49, 2012.
156. Caglayan, B, Caglayan, AB, Beker, MC, Yalcin, E, Beker, M, Kelestemur, T, et al. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* **296**, 23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024, 2017.
157. Siesjo, BK. Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol* **9**, 31-88. doi: 1988.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/03/2016	35		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Diyet restriksiyonu ile ön koşullandırma tekniğinin fare beyin felci modelindeki nöroprotektif etkisinin araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 15/04/2016-2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serdar	Soyadı	ALTUNAY
Doğum Yeri	Üsküdar/İstanbul	Doğum Tarihi	03.09.1991
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail	altnyserdar@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2014
Lise	Gültepe Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	62.5							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71.48	69.31	60.49
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/Ödülleri/Diğer

Uluslararası Bildiriler

1. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, **Altunay S**, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Sarma M, Kilic E, “The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. Poster- Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Yalcin E, **Altunay S**, Kelestemur T, Gunal MY, Hanoglu L, Yulug B, Kilic E, “Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neuronal survival in the acute phase and stroke- recovery in the sub-acute phase of focal cerebral ischemia” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
3. Poster- Yalcin E, Caglayan AB, Beker MC, Gurel B, Kelestemur T, Caglayan B, Dalay A, Dilden A, **Altunay S**, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, “Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
4. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, **Altunay S**, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E, “Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.

Ulusal Bildiler ve Sözlü Sunumlar

1. Sözlü Sunum- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Dalay A, **Altunay S**, Sertel E, Kilic E, “Effects of Circadian Rhythm on Brain Injury and Related Molecular Mechanisms” 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 20/32, Düzce, 2016.
2. Sözlü Sunum- Kelestemur T, Beker MC, Caglayan AB, Yalcin E, **Altunay S**, Dalay A, Sertel E, Dilden A, Caglayan B, Kilic E, “Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia” Turkish Society

ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/
Turkey, 2016.

3. Poster- Yalcin E, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, Caglayan B, **Altunay S**, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kilic E, “The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress , PC108, Düzce/Turkey, 2016.
4. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, **Altunay S**, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Saarma M, Kilic E, “Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası