



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MELATONİN VE NORMOBARİK OKSİJEN TEDAVİ  
KOMBİNASYONUNUN BEYİN FELCİ SONRASI  
NÖROPROTEKTİF ROLÜ**

MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2018

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam esnasında bilgi ve birikimleri ile yönlendirmelerde bulunan Prof. Dr. Gürkan Öztürk ve Prof. Dr. Ülkan Kılıç'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzun yıllar beraber çalıştığım ve bir parçası olmaktan her zaman gurur duyduğum ekip arkadaşlarım; Öğr. Gör. Dr. Ahmet Burak Çağlayan, Öğr. Gör. Dr. Taha Keleştemur, Dr. Öğr. Üye. Berrak Çağlayan ve Öğr. Gör. Dr. Esra Yalçın'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan ve en büyük destekçim olan başta eşim Merve ve kızım Mina olmak üzere kıymetli aileme en kalbi dileklerle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

<b>TEZ ONAYI</b> .....	i
<b>BEYAN</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	ix
<b>RESİMLER LİSTESİ</b> .....	xi
<b>1- ÖZET</b> .....	1
<b>2- ABSTRACT</b> .....	2
<b>3-GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4-GENEL BİLGİLER</b> .....	4
4.1. Beyin felci .....	5
4.1.1. Beyin felcinin patofizyolojisi .....	5
4.1.2. Oksidatif hasar.....	8
4.1.3. Apoptotik hücre ölüm mekanizması.....	9
4.2. Oksijen Tedavisi.....	11
4.2.1. Normobarik oksijen tedavisi .....	11
4.2.2. Hiperbarik oksijen tedavisi.....	12
4.3. Melatonin.....	14
4.3.1. Melatonin sentezi .....	15
4.3.2. Melatonin üretimi ve düzenlenmesi .....	16
4.3.3. Melatoninin patofizyolojik süreçlerdeki rolü .....	17
4.3.4. Melatoninin antioksidan özellikleri.....	19
4.3.5. Melatoninin iskemi/ reperfüzyon hasarındaki rolü .....	20
<b>5-MATERYAL VE METOT</b> .....	22
5.1. Deney grupları .....	22
5.2. Orta serebral arter tıkanması modeli .....	23
5.3. Melatonin ve taşıyıcı enjeksiyonlarının uygulanması .....	26
5.4. NBO tedavisinin uygulanması.....	26
5.5. Nörolojik skora.....	26

5.6.	Cryostat cihazı ile beyin kesimi .....	27
5.7.	TUNEL boyaması.....	28
5.8.	Cresyl violet boyaması .....	29
5.9.	İmmunoglobulin G boyaması.....	29
5.10.	Western blot protein analizi .....	30
5.10.1.	Protein izolasyonu .....	30
5.10.2.	Protein konsantrasyon ölçümü .....	30
5.10.3.	Jel elektroforezi .....	31
5.10.4.	Jelden membrana protein transferi .....	32
5.10.5.	Antikorlar ile inkübasyon .....	33
5.10.6.	Görüntüleme ve değerlendirme .....	34
5.11.	Lazer Speckle görüntüleme tekniği .....	35
5.12.	İstatistiksel analizler .....	36
<b>6-BULGULAR</b>	.....	<b>37</b>
6.1.	30 dakikalık OSA tıkanması Laser Doppler kaydı.....	37
6.2.	DNA fragmantasyonu analizi .....	37
6.3.	90 dakikalık OSA tıkanması Laser Doppler kaydı.....	39
6.4.	Nörolojik hasar skorlama .....	40
6.5.	İnfarkt hacmi analizi.....	41
6.6.	Ödem analizi.....	43
6.7.	Kan-beyin bariyeri geçirgenliği.....	44
6.8.	Western Blot sonuçları .....	45
6.8.1.	$\beta$ -Aktin protein analizi.....	46
6.8.2.	Fosforlanmış Akt protein analizi .....	47
6.8.3.	Bax protein analizi.....	48
6.8.4.	Bcl-xL protein analizi.....	49
6.8.5.	nNOS protein analizi .....	50
6.8.6.	eNOS protein analizi .....	51
6.8.7.	iNOS protein analizi .....	52
6.9.	Lazer Speckle görüntüleme tekniği ile beyin kan akımı takibi .....	53
6.9.1.	İskemik kor bölgesindeki kan akımı .....	54
6.9.2.	Penumbra bölgesindeki kan akımı.....	55

6.9.3. Hasarsız korteks bölgesindeki kan akımı .....	56
<b>7-TARTIŞMA</b> .....	57
<b>8-SONUÇ</b> .....	64
<b>9-KAYNAKLAR</b> .....	65
<b>10-ETİK KURUL ONAYI</b> .....	81
<b>11-ÖZGEÇMİŞ</b> .....	82



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AAAD	Triptofan hidroksilaz
AADC	5-Hidroksi-L-Triptofan Dekarboksilaz
AANAT	Arylalkylamine N Asetil Transferaz
ADP	Adenozin Difosfat
AFMK	N1-Asetil-N2- Formil-5-Metoksi Knüramin
AIF	Apoptoz İndükleme Faktörü
AMK	N1-Asetil 5- Metoksi Küramin
AMPA	A-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit
Apaf-1	Apoptotik Protein Aktive Edici Protein-1
ASMT	Asetil-Serotonin O-Metil Transferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
HBO	Hiperbarik Oksijen
HIOMT	Hidroksi İndol-O-Metil Transferaz
I/R	İskemi/ Reperfüzyon
IL-1 $\beta$	İnterleukin-1 $\beta$
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDF	Laser Doppler akımı
LSI	Laser Speckle Görüntüleme
MMP	Matris Metalloproteaz
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NBO	Normobarik Oksijen
NMDA	N-metil- D-aspartat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OSA	Orta Serebral Arter
PARP-1	Poly-(ADP-ribose) Polymerase-1
PBS	Fosfat Tamponu Solüsyonu
PFA	Paraformaldehit

PVDF	Poli-Viniliden Florür
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SKN	Suprakiazmatik Nükleus
SOD	Süperoksit Dismutaz
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1.1. Beyin felci sonrası oluşan iskemik kor ve penumbra bölgesi.....	6
Şekil 4.1.1.2. OSA tıkanması sonrası iskemik alanda görülen patofizyolojik süreçler7	
Şekil 4.1.3.1. Beyin felci sonrası apoptotik hücre ölüm mekanizması.....	10
Şekil 4.3.1. Melatoninin moleküler formülü (N-asetil 5-metoksi triptamin).....	14
Şekil 4.3.1.1. Melatonin sentezi.....	15
Şekil 4.3.2.1. Melatonin hormonunun sirkadiyen ritme bağlı üretimi.....	16
Şekil 4.3.2.2. Melatonin hormonunun yaşlanmaya bağlı üretimi.....	16
Şekil 4.3.3.1. Melatoninin iskemi/ reperfüzyon sırasında görülen patofizyolojik süreçlere olan etkilerinin şematik olarak gösterimi. ....	18
Şekil 4.3.4.1. Oksijen serbest radikallerinin etkilediği sistemler.....	19
Şekil 5.1.1. 90 dk ve 30 dk OSA tıkanması deney dizaynı.....	23
Şekil 5.1.2. Lazer Speckle görüntüleme tekniği deney dizaynı.....	23
Şekil 5.2.1. Deneysel OSA tıkanması metodu.....	25
Şekil 5.11.1. Lazer Speckle görüntülemesinin yapıldığı iskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks seviyelerinin gösterimi .....	36
Şekil 6.1.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı .....	37
Şekil 6.2.1. TUNEL (+) hücre analizi.....	38
Şekil 6.3.1. 90 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı .....	39
Şekil 6.4.1. Nörolojik skora ..... 40	
Şekil 6.5.1. Cresyl violet boyaması ile infarkt hacmi ölçümü.....	42
Şekil 6.6.1. Cresyl violet boyaması ile sitotoksik ödem hesaplanması .....	43
Şekil 6.7.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin iskemik korteks ve striatum seviyesinde değerlendirilmesi .....	44
Şekil 6.8.1.1. $\beta$ -Aktin protein seviyesi.....	46
Şekil 6.8.2.1. Fosforlanmış Akt protein seviyesi.....	47
Şekil 6.8.3.1. Bax protein seviyesi.....	48
Şekil 6.8.4.1. Bcl-xL protein seviyesi.....	49
Şekil 6.8.5.1. nNOS protein seviyesi .....	50
Şekil 6.8.6.1. eNOS protein seviyesi .....	51
Şekil 6.8.7.1. iNOS protein seviyesi.....	52
Şekil 6.9.1. LSI tekniği ile beyin kan akımı analizi.....	53



<b>Şekil 6.9.1.1.</b> İskemik kor bölgesindeki toplam kan akımı.....	54
<b>Şekil 6.9.2.1.</b> İskemik penumbra bölgesindeki toplam kan akımı.....	55
<b>Şekil 6.9.3.1.</b> İskemik hemisferde hasardan etkilenmeyen korteks alanındaki toplam kan akımı.....	56



## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 5.2.1.</b> İzofloran gaz anestezi sistemi ve oksijen sensörü. ....	24
<b>Resim 5.2.2.</b> Beyin felci operasyon masası .....	25
<b>Resim 5.6.1.</b> Cryostat cihazı .....	27
<b>Resim 5.7.1.</b> Konfokal mikroskobu .....	28
<b>Resim 5.10.2.1.</b> Qubit protein ölçüm cihazı. ....	31
<b>Resim 5.10.3.1.</b> Jel elektroforez sistemi. ....	32
<b>Resim 5.10.6.1.</b> Trans-blot turbo transfer sistemi. ....	34
<b>Resim 5.11.1.</b> Laser Speckle görüntüle tekniği deney düzeneği. ....	35



## 1. ÖZET

### MELATONİN VE NORMOBARİK OKSİJEN TEDAVİ KOMBİNASYONUNUN BEYİN FELCİ SONRASI NÖROPROTEKTİF ROLÜ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre beyin felci dünyada ölüm sebepleri bakımından 2. sırada yer alan bir hastalıktır. Her üç beyin felci vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken beyin felci sonrası hayatta kalanlar ise yaşamlarının geri kalanını ciddi nörolojik eksiklikler ile sürdürmek zorunda kalmaktadır. Klinik açıdan beyin felci sonrası yüksek konsantrasyonda normobarik oksijen (NBO) tedavisinin uygulanması reperfüzyon hasarını, serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretimi üzerinden arttırması nedeniyle yıllardır büyük tartışmalara neden olmaktadır. Aynı zamanda penumbra bölgesindeki elektriksel dalgalanmaların da kan damarlarında daralmaya neden olduğu patofizyolojik süreçler düşünüldüğünde NBO tedavisinin tekrar değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Beyin felci sonrasında özellikle iskemik alanda artan ROS'ların NBO tedavisi ile beraber daha fazla artacağı düşünüldüğünde bu tedavinin serbest radikal yakalayıcı bir molekül olan melatonin ile kombinasyonunun tedavinin etkinliği arttıracığı düşünülmektedir. Bunun için beyin felci sonrası %21, %70 veya %100 NBO tedavilerinin tek başlarına veya melatonin ile kombinasyonun etkisini araştırabilmek için 8-12 haftalık erkek Balb/c farelere 30 veya 90 dakikalık orta serebral arter tıkanması sonrası sırasıyla 72 veya 24 saat reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Reperfüzyonun hemen başlangıcında farelere %21, %70 veya %100 NBO tedavileri uygulanmış ve 4 mg/kg melatonin veya taşıyıcı intraperitonel olarak uygulanmıştır. Bu tez kapsamında orta serebral arter tıkanması metodu kullanarak gerçekleştirilen beyin felci sonrasında uygulanan %100 NBO tedavisi ve bu tedavinin melatonin ile kombinasyonu DNA kırıklarının oluşumunu, hasar alanını, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğini azaltırken, nörolojik iyileşmeyi ve iskemik bölgedeki beyin kan akımını arttırdığı görülmüştür. Elde edilen bulguların özellikle beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni strateji ve hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Beyin felci, Beyin kan akımı, Kan beyin bariyeri geçirgenliği, Melatonin, Normobarik oksijen tedavisi

## **2. ABSTRACT**

### **THE NEUROPROTECTIVE ROLE OF MELATONIN AND NORMOBARIC OXYGEN THERAPY AFTER CEREBRAL ISCHEMIA**

Stroke is the second leading cause of death worldwide according to World Health Organization data. One third of all stroke cases results in death, while the survivors suffer from serious neurological deficits for the rest of their lives. Use of high concentration normobaric oxygen (NBO) therapy following stroke in the clinic is under substantial debate for many years since it results in increased production of reactive oxygen species (ROS). In addition, considering the pathophysiological processes which result in vasoconstriction due to the electrical fluctuations in the penumbra, it is important to re-evaluate the use of NBO therapy. It is believed that the efficacy of combinatory treatment consisting NBO therapy with free radical scavenger melatonin is going to be enhanced, as the increased ROS following cerebral ischemia are further promoted in the ischemic area by NBO. To this end, to investigate the effects of 21%, 70% or 100% NBO treatment alone or in combination with melatonin after cerebral ischemia, 8-12 weeks-old male Balb/c mice were subjected to 30 or 90 minutes of middle cerebral artery occlusion followed by 72 or 24 hours of reperfusion. Immediately at the onset of reperfusion, 21%, 70% or 100% NBO treatments and 4 mg/kg melatonin or vehicle control were administered intraperitoneally. In this thesis, 100% NBO treatment and combination of this treatment with melatonin, which was applied after cerebral ischemia that was carried out using middle cerebral artery occlusion method was demonstrated to decrease DNA fragmentation, infarct area, brain edema and blood brain barrier permeability, while increasing neurological recovery and cerebral blood flow in the ischemic region. The obtained results are expected to contribute to the identification of new strategies and target molecules intended for treatment of neurodegenerative disorders, especially such as brain ischemia.

**Key Words:** Blood brain barrier permeability, Cerebral blood flow, Cerebral ischemia, Melatonin, Normobaric oxygen therapy

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre beyin felci dünyada ölüm sebepleri bakımından incelendiğinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer alan bir hastalıktır (1). Her üç beyin felci vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken beyin felci sonrası hayatta kalanlar ise yaşamlarının geri kalanını ciddi nörolojik eksiklikler ile sürdürmek zorunda kalmaktadır. Bu denli ciddi ve önemli bir hastalığın bu zamana kadar bilinen tek tedavisi ilk 4 saat içerisinde uygulanması gereken doku plasminojen aktivatörü (tPA) tedavisidir (2). Beyin felci ile alakalı yapılan binlerce deneysel çalışma sonrası 60'ın üzerinde klinik çalışma başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Klinik çalışmaların başarısızlıkla sonuçlanması özellikle ilaç bazında yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi amacıyla tedavi stratejilerinin güncellenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Beyin felci gibi ağır bir hastalıkta aylar sonra dahi apoptotik hücre ölümünün gözlemlendiği bir patofizyolojik süreçte trombolitik ilaçların ilk üç saatlik kullanımını dışında herhangi bir klinik ilaç tedavisinin olmaması araştırmacıların bu konu üzerine yoğunlaşmalarına neden olmaktadır.

Beyin felci sonrası serebral kan akımının engellenmesi beyinde oksijen ve glikoz eksikliğine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak iskemik beyin bölgesindeki oksijen seviyesinin artırılması önemli tedavi stratejileri arasında yer almaktadır. Oksijen tedavileri uygulanan basınç miktarına bağlı olarak normobarik oksijen (NBO) ve hiperbarik oksijen (HBO) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda HBO tedavisinin beyin felci sonrasında uygulanması farklı sonuçların oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca HBO tedavisinin dezavantajları ve yan etkilerinden dolayı kolay uygulanabilir, ucuz ve daha az yan etkiye sahip olan NBO tedavisi ön plana çıkmaktadır.

Beyin felci sonrasında özellikle iskemik alanda artan serbest oksijen radikallerinin NBO tedavisi ile beraber daha fazla artacağı düşünüldüğünde bu tedavinin serbest radikal yakalayıcı bir molekül olan melatonin ile kombinasyonunun tedavinin etkinliği arttıracığı düşünülmektedir. Melatonin lipofilik yapısı nedeniyle kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir. İmmün sistemle uyumlu ve yan etkisi yok denecek kadar azdır.

Bu tez kapsamında orta serebral arter tıkanması metodu kullanarak gerçekleştirilen beyin felci sonrasında uygulanan NBO tedavisi ve bu tedavinin melatonin ile kombinasyonunun beyin felci sonrası gelişen apoptotik hücre ölümü, nöronal sağkalım, hasar alanı, beyin ödemi, kan beyin bariyeri geçirgenliğinin yanı sıra NBO tedavisinin ve melatonin kombinasyonunun hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan bu tez kapsamında elde edilen bulguların özellikle beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni strateji ve hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.



## 4. GENEL BİLGİLER

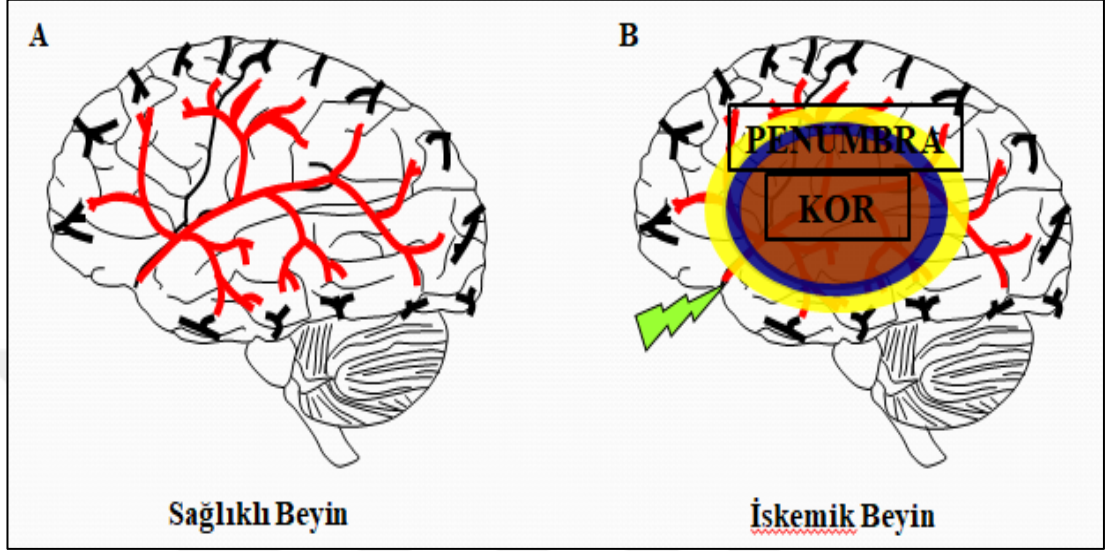
### 4.1. Beyin Felci

Beyin felci dünyada ölüm nedenleri bakımından incelendiğinde 2. sırada yer almaktadır. Beyin felcinin günümüze kadar bilinen tek tedavisi ilk 4 saat içerisinde uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü tedavisidir (3, 4). Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization) verilerine göre her 400 kişiden birinde beyin felci görülmektedir ve her yıl yaklaşık 4.7 milyon insan beyin felcinden dolayı hayatını kaybetmektedir. Genelde 65 yaşın üzerinde beyin felci insidansında bir artış gözlemlenmesine rağmen yeni doğan ve çocuklarda da görülebilmektedir (5). Beyin felci kalp hastalıklarından sonraki 2. ölüm nedeni olup yaklaşık ölümlerin %9'unu oluşturmaktadır. Morbidite açısından ise beyin felci ilk sırada olup hastaların yaklaşık %40'ından artık bağımsız bir yaşam sürdürmesi beklenmemektedir (6). Beyin felci vakalarının yaklaşık %80'i orta serebral arterin tıkanması (iskemik inme) sonucu meydana gelirken geri kalan %20'lik kısmı ise beyin kanaması (hemorajik felç) nedeniyle meydana gelmektedir (7).

#### 4.1.1. Beyin felcinin patofizyolojisi

Beyin felci patofizyolojik açıdan değerlendirildiğinde; beyne giden damarların tıkanması veya hemoraji sonrası beyne yeterli miktarda oksijen (O<sub>2</sub>) ve glikoz gidememesine bağlı olarak gelişen karmaşık hasar mekanizmalarıdır. Lokal beyin hasarı sonrasında hasarlı bölge patofizyolojik açıdan iki farklı bölümde incelenmektedir (Şekil 4.1.1.1.) (8, 9). Hasarlı bölgenin orta kısmı iskemik kor bölgesini oluşturmaktadır. Bu bölgedeki kan akımının önemli ölçüde azalmasına bağlı olarak kor bölgesinde hızlı nekrotik hücre ölümü baskındır. Hasarlı bölgenin perifer kısmını oluşturan bölge penumbra bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgedeki kan akımı iskemik kor bölgesine göre daha iyi durumdadır. Penumbra bölgesindeki hücrelerde özellikle apoptotik hücre ölümü gözlemlenmektedir. Bu alandaki hücreler beyin felci sonrası oluşan iyonik düzensizliğe karşı hayatta kalmaya çalışmaktadırlar. (10, 11). Penumbra bölgesindeki hücreler etrafta kısıtlı seviyede bulunan glikoz molekülünü kullanmaya çalışır ve hücre içi sinyal yollarından özellikle hücresel sağkalım ile alakalı olan sinyal yolları vasıtasıyla hayatta kalmaya çalışır.

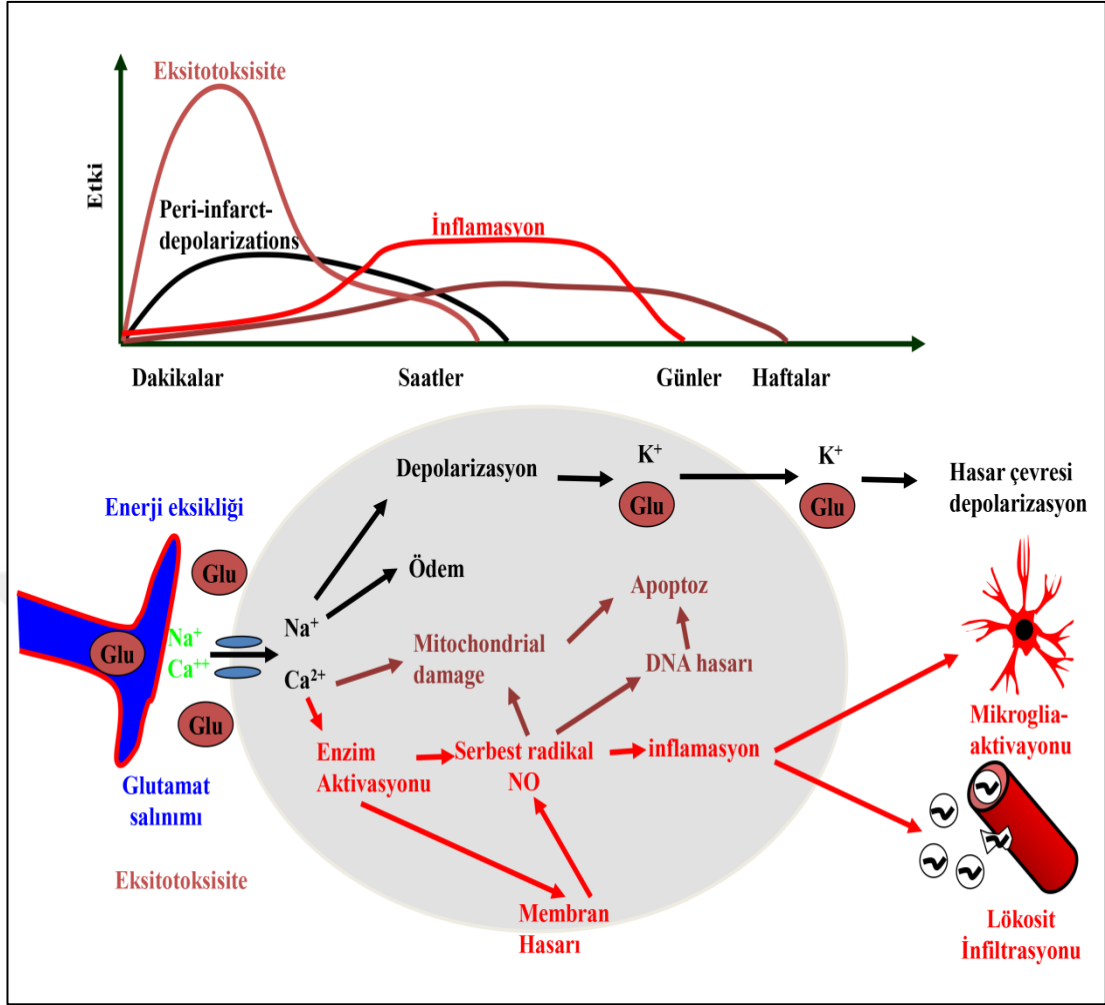
Literatürde yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu kurtarılabılır bölge olarak da bilinen ve asıl hasar bölgesinin etrafını oluşturan penumbra bölgesine yöneliktir (12-14).



**Şekil.4.1.1.1.** Beyin felci sonrası oluşan iskemik kor ve penumbra bölgesi. Dirnagl ve ark. 1999 yılındaki çalışmasından adapte edilmiştir (11).

Beyin dokusu diğer dokular ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde oksijen ve glikoz kullanımı söz konusu olup enerji üretimi hemen hemen tamamıyla oksidatif fosforilasyona bağımlılık göstermektedir. Beyin felcinin akut fazında beynin belli bölgesine gelen kan akışının durması beyinde önemli bir enerji eksikliğine sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak oluşan enerji eksikliği bu alanda bulunan nöron ve glia hücrelerinin membran potansiyellerini kaybederek depolarize olmalarına neden olacaktır. Depolarize olan hücreler uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamayı sinaptik boşluğa ve ekstrasellüler sıvıya vermelerine neden olmaktadır. Aynı zamanda enerji eksikliği nedeniyle glutamat geri alım mekanizmalarının da işlevlerini kaybetmeleri hücreler arası boşlukta aşırı miktarda glutamat birikimine neden olmaktadır. Bu olay beyin felci patofizyolojisinde glutamat eksitotoksitesisi (excitotoxicity) olarak adlandırılmaktadır (15, 16). Ekstrasellüler sıvıda biriken glutamat özellikle glutamat reseptörleri olarak da bilinen NMDA (N-metil- D-aspartat) ve AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit) reseptörlerini uyararak hücre içerisine pozitif yüklü iyonların girmesine neden olmaktadır (17, 18).





**Şekil 4.1.1.2.** OSA tıkanması sonrası iskemik alanda görülen patofizyolojik süreçler. Dirnagl ve ark. 1999 yılındaki çalışmasından adapte edilmiştir (11).

Postsinaptik nöronların glutamat ile uyarılması sonrasında hücre içerisine pozitif yüklü iyonların girişi söz konusu olmaktadır. Hücre içerisine giren sodyum ( $\text{Na}^+$ ) iyonları postsinaptik nöronun membran potansiyeli değiştirerek hücrenin hızlı bir şekilde depolarize olmasına neden olmaktadır. Depolarize olan nöronlar tekrardan ekstrasellüler sıvıya glutamat ve potasyum ( $\text{K}^+$ ) iyonlarının salınımına neden olmaktadır (11). Bu süreç beyin felcinin olduğu alandan perifere doğru dalga şeklinde yayılan uyarılmalara hasar çevresi depolarizasyona (peri-infarct depolarization) neden olmaktadır. Bu süreç hasar çevresinde az miktarda enerji ile yaşamaya çalışan nöronların enerji ihtiyaçlarını daha da arttırarak ölümlerine neden olabilmektedir. (19). Bu uyarı dalgalarının beyin felci sonrası oluşan hasarın yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (20). Hücre içine giren  $\text{Na}^+$  iyonunun girmesi ekstrasellüler

sıvıdan klor ( $Cl^{-1}$ ) iyonlarının da hücre içine çekilmesine neden olmaktadır. Hücre içerisinde artan  $Na^{+1}$  ve  $Cl^{-1}$  iyonları hücre içinde NaCl oluşumuna neden olarak hücre dışından hücre içine su girişine neden olmaktadır. Hücrelerin su alarak hacimlerinin artması sonrasına bağlı olarak sitotoksik beyin ödeminin oluşumuna neden olmaktadır. Glutamat nörotoksitesisi sonrası hücre içinde aşırı artan kalsiyumun ( $Ca^{+2}$ ) aktive ettiği enzimler hücre membranının yıkımında görevli olan enzimleri aktive ederek hücre membranının hasarlanmasına neden olacaktır. Ayrıca hücre içinde artan  $Ca^{+2}$  seviyesi hem serbest radikallerin artmasına neden olmaktadır (21). Devam eden süreçte yangının uyarılması sonrasında lökosit infiltrasyonu ve mikroglia aktivasyonu gözlenmektedir. İskemik beyin hasarı sonrası 24 saat içerisinde mikroglia aktivasyonu gözlemlenmektedir ve bu aktif mikroglia hücreleri interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) salgılayarak beyin hasarının artmasına neden olmaktadır (22). Ek olarak hücre içinde artan  $Ca^{+2}$  nitrik oksit (NO) enzimleri ile beraber mitokondri hasarına ve DNA hasarına sebep olarak hücrenin programlı hücre ölümüne (apoptoz) neden olmaktadır (16).

#### **4.1.2. Oksidatif hasar**

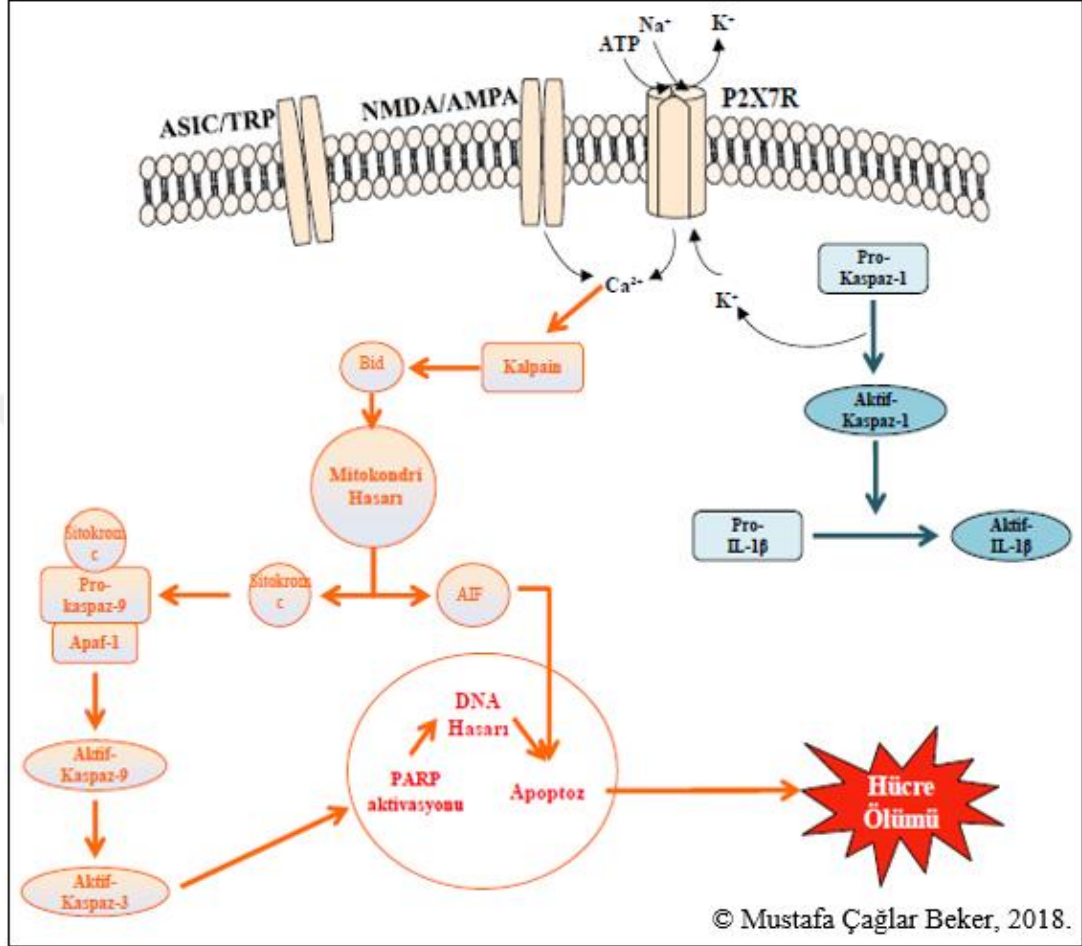
Patofizyolojik süreçler sonunda hücre içi  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+1}$  ve Adenozin difosfat (ADP) seviyelerinin yüksek olması mitokondriye yüksek miktarda reaktif oksijen türlerini ürettirmektedir. Diğer organların aksine beyin nispeten düşük endojen antioksidan seviyelerine sahip nöronlara bağlı olarak özellikle reaktif oksijen türlerine karşı savunmasızdır. Yüksek miktarda bulunan ve zararlı olan oksijen radikaller hücrel makromoleküllerin yok edilmesine ve apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanan hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (23, 24). İskeminin indüklenmesi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerini harekete geçirerek NO oluşumu arttırmaktadır. NO süperoksit ile birleşerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit üretiminde de görev almaktadır (24). Bu bilgilere ek olarak NO üretimi ve oksidatif stres DNA tamir enzimi olarak bilinen poly-(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1)'in aktivasyonuna neden olmaktadır. PARP-1'in aşırı aktif hale getirilmesi; anaerobik glikoliz ve mitokondriyal solunum gibi nicotinamide adenine dinucleotide ( $NAD^{+}$ ) bağımlı süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır. Bu süreç sonunda ortaya çıkan adenozin trifosfat (ATP) açlığı, enerji kaybı ve nöronal ölüm mekanizmaları  $NAD^{+}$  hücrelerin ölmesine neden olmaktadır (25).

İskemi sonrası bölgesel kanlanmanın tekrar başlaması (reperfüzyon) esnasında NO, süperoksit ve peroksinitrat üretiminde bir artış meydana gelmektedir. Artan bu radikaller özellikle damar çevresinde yoğunlaşması nedeniyle reperfüzyon hasarında çok önemli rolleri bulunmaktadır. Bu radikaller bazal laminada kollajen ve lamininleri parçalayan matris metalloproteazları (MMP) aktive eder ve kan beyin bariyeri (KBB) bütünlüğünü bozarak KBB geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır (26, 27). Bu bilgilere ek olarak, oksidatif ve nitratif stres ayrıca nötrofillerin ve diğer lökositlerin serebral vaskülatüre götürülmesini ve göçününün tetiklenmesinde de önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca bazal laminanın bozunmasını ve vasküler geçirgenliği daha da arttıran enzimleri serbest bırakılmasına neden olmaktadır. Bu süreçler, parankimal hemoraji, vazojenik beyin ödemi ve beyindeki nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (26, 28).

#### **4.1.3. Apoptotik hücre ölüm mekanizması**

Beyin felci sonrası homeostazın bozulmasını takiben patofizyoloji sürecinde apoptozun intrinsik ve ekstrinsik sinyal yolları mekanizmaları devreye girmektedir. Aktif duruma geçen apoptotik sinyal yolları özellikle penumbra bölgesindeki hücrelerin apoptoza gitmelerine neden olmaktadır. Beyin felci sonrası glutamat bağımlı NMDA, AMPA ve aside duyarlı reseptörler (ASIC) vasıtasıyla hücre içi kalsiyum seviyeleri yükselmektedir. Artan hücre içi  $Ca^{+2}$  kalpainleri aktive edilmesine ve Bid proteinin kesilmesine yol açarak tBid formuna dönüşmesine neden olmaktadır. Mitokondri membranında tBid apoptotik protein olan Bad ve Bax ile etkileşim halindedir (29, 30). Ayrıca apoptoz karşıtı protein olan Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerini de etkilemektedir. tBid mitokondri membranına hasar verilmesine neden olarak mitokondrinin porlarından sitokrom c' nin veya apoptoz indükleme faktörü'nün (AIF) salınmasına neden olmaktadır. Sitozol içerisine salınan sitokrom c apoptotik protein aktive edici protein-1 (Apaf-1) ve pro-kaskaz-9 ile beraber apoptozom kompleksinin yapısına katılmaktadırlar (29, 30). Apaf-1 sırasıyla kaspaz-9 ve sonrasında da kaspaz-3'ün aktifleşmesine neden olmaktadır Aktif-kaspaz-3 çekirdek içerisinde DNA tamir enzimi olan PARP'ın kırılmasına neden olmaktadır ve sonrasında kırılmış olan PARP apoptozu ve hücre ölümünü tetiklemektedir (29, 31). Ayrıca hücre içerisinde aktif halde bulunmayan kaspaz-1 aktifleşerek aktif-kaspaz-1 formuna dönüşmektedir

(Şekil 4.1.3.1.). Aktif kaspaz-1 inflamasyon (yangı) proteinlerinden biri olan IL-1 $\beta$ 'nın aktifleşerek hücre içerisinde yangının tetiklenmesine neden olmaktadır (29).



Şekil 4.1.3.1. Beyin felci sonrası apoptotik hücre ölüm mekanizması.

Ekstrinsik sinyal yolağında Fas ligandı Fas ölüm reseptörlerine bağlanmaktadır ve hücre içerisinde pro-kaspaz-8 halinde bulunan kaspaz-8'in aktifleşmesine neden olmaktadır. Aktif-kaspaz-8 Bid proteininin tBid formuna dönüşmesini ve sonrasında da mitokondri membranında bir hasara sebep olarak apoptoz sinyal yolağının aktifleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca aktif-kaspaz-8 direkt olarak kaspaz-3 üzerine etki ederek de apoptoz sinyal yolağının devam ettirilmesine katkıda bulunmaktadır (29, 32).

## 4.2. Oksijen Tedavisi

Oksijen tedavileri uygulama esnasında kullanılan basınç miktarına bağılı olarak NBO ve HBO olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Noninvazif olarak uygulanabilen oksijen tedavileri özellikle iskemiye bağılı olarak gerçekleşen beyin felci ve serebral palsy gibi patofizyolojik süreçlerde hedef dokuda oksijen miktarını arttırmak için yaygın olarak kullanılan etkin bir tedavi yöntemidir.

### 4.2.1. Normobarik oksijen tedavisi

Normobarik oksijen (NBO) tedavisi uygulanan havanın atmosfer basıncının (ATA) 1 olduğu ve oksijen oranının da %21 O<sub>2</sub>'den daha fazla olmasıdır. NBO tedavisi sahip olduğu özelliklerden dolayı hiperbarik oksijen (HBO) tedavine oranla daha avantajlıdır. NBO tedavisi HBO tedavisine göre daha ucuz, kolay erişilebilir olması ve özellikle akut iskemik durumlarda acil müdahale ekiplerinin yanlarında getirip kolayca uygulayabileceği bir yöntemdir. Ayrıca iskemi sonrası evde bakım gerektiren durumlarda da kolaylıkla uygulanabilen bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır.

Normal fizyolojik koşullarda, deniz seviyesinde hemoglobinin oksijen doygunluğu %95'den fazladır. Uygulanan NBO tedavisi oksijenin hemoglobine bağlanma kapasitesini arttırmamaktadır. Bu sebepten dolayı fizyolojik olarak plazmada çözülmüş oksijen oranı NBO tedavilerinde daha önemli bir konuma gelmektedir. Fizyolojik koşullar altında 37°C de Bunsen çözünürlük katsayısına göre oksijen 0.003 ml O<sub>2</sub>/ mmHg/ ml kandır. Buna göre NBO aort içerisindeki oksijenin arteryel basıncını (pO<sub>2</sub>) 84.1 mmHg'dan 345 mmHg (1mmHg=0.133 kPa)'ya arttırdığı, küçük arteriyollerde ise 60.9'dan 154 mmHg seviyelerine çıkartmaktadır (33-35). Dakikada 45 L uygulanan NBO fizyolojik olarak 100 ml kanda çözünen O<sub>2</sub> fraksiyonunu 0.3 ml'den yaklaşık olarak 2 ml'ye çıkartmaktadır (36).

Orta serebral arter tıkanması metodu kullanılarak yapılan deneysel beyin felci metodu sonrası, NBO tedavisinin beyin felci sonrası patolojiyi ve nörolojik davranışları arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (37, 38). Ayrıca bu çalışmalarda nöro-görüntüleme teknikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarda özellikle

beyinde iskemik hasarın azalmasına katkı sağladığı gösterilmiştir (38, 39). Bu bilgilere ek olarak, deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda iskemi sırasında veya sonrasında reperfüzyonun hemen başlangıcında uygulanan NBO tedavisinin, normal atmosfer oksijeni (%21 O<sub>2</sub>) alan hayvanlara göre kıyaslandığında beyin hasarını %70'e kadar azalttığı gösterilmiştir (40). Literatürde yapılan en az iki çalışmada oksijen tedavisinin beyin oksijen seviyesini arttırmada etkisiz olduğunu göstermiştir (41). Oksijen tedavisine bağlı olarak pO<sub>2</sub> seviyesinin kolay bir şekilde yaklaşık olarak 200 mmHg'ya çıkmasının beyin felci gibi patofizyolojik süreçlerde bir etkisinin olmadığını gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan başka çalışmalarda ise beyin felci sonrası uygulanan %95 NBO tedavisinin beyin hasarını hemen hemen iskemi öncesi duruma getirdiği gösterilmiştir (42).

NBO tedavisi kemirgenler üzerinde yapılan deneylerde tedavinin başlama süresine göre farklı sonuçların oluşmasına neden olmaktadır. İskemiden hemen sonra ilk 30 dakika içerisinde uygulanan NBO tedavisi daha iyi nörolojik sonuçlar vermiştir. Ancak sıçanlarda yapılan ve iskemiden 120 dk sonra uygulanan NBO tedavisinde ise hasar alanının kontrol gruplarına göre kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmediği gözlemlenmiştir (39, 43). Yapılan bir başka çalışmada ise iskemi sonrası 60 dakika sonra uygulanan NBO tedavisinin hasar sıçanlarda hasar alanını arttırdığı gösterilmiştir (44).

Literatürde bulunan çoğu çalışma NBO tedavisinin olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir (45-47). Beyin felci sonrası hemen reperfüzyon esnasında uygulanan uzun veya kısa süreli NBO tedavileri iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (33, 48). Ayrıca reperfüzyon esnasında verilen NBO oksidatif stres ve ROS üretimini azaltmaktadır (42, 49).

#### **4.2.2. Hiperbarik oksijen tedavisi**

HBO tedavisi %21 O<sub>2</sub>'den fazla miktarda O<sub>2</sub>'nin 1 atmosfer basıncından yüksek miktarda basınç uygulanarak verilmesidir. HBO tedavisi NBO tedavisine kıyasla daha az kullanılan bir yöntemdir. Çünkü HBO tedavisinin az bulunur olması, pahalı ve uygulanması zor olduğundan dolayı birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca HBO tedavisi 1960'lı yıllardan beri kullanılan güvenli ve yararlı tedavi

yöntemlerden biridir. Fakat özellikle beyin felci gibi karmaşık bir patofizyolojiye sahip hastalıklarda özellikle klinik çalışmalarda farklı sonuçların oluşmasına neden olmuştur.

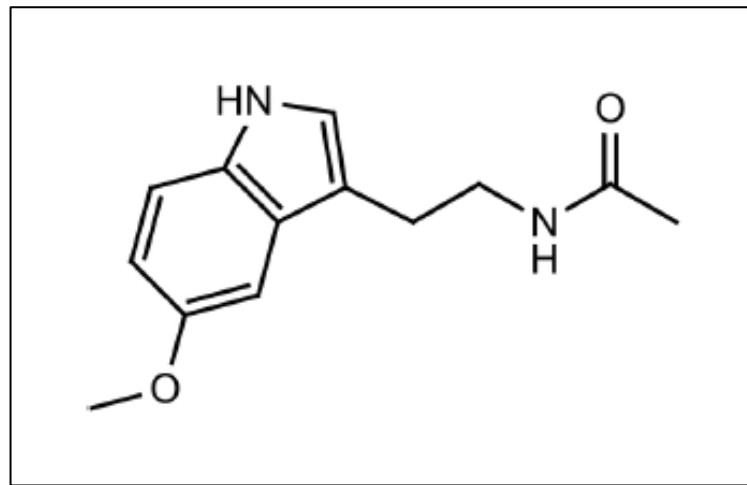
Son 30 yıl içerisinde yapılan bilimsel çalışmalar, beyin felci sonrası gerçekleşen geri döndürülemez hasara dört temel hücresel mekanizmanın etki ettiğini göstermiştir. Bu mekanizmalar; eksitotoksisite, oksitadif/ nitrosatif stres, inflamasyon (yangı) ve apoptozdur. Beyin dokusunun oksijenlenmesi bu önemli sinyal yollarına pozitif etki ederek koruyucu bir etki göstermektedir. HBO tedavisi sonrasında elde edilen bulgular; plazmada çözülmüş oksijen konsantrasyonu yaklaşık olarak on kat arttıracığı, iskemik dokularda oksijen difüzyonunu kolaylaştıracağı ve hemoglobine bağlı taşınan oksijen miktarını arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalar HBO tedavisinin zamana bağlı olarak birden fazla biyokimyasal, moleküler ve hücre dinamiği mekanizmalarını aktifleştirdiği gösterilmiştir (50). Beyin felci sonrası uygulanan HBO tedavisinin asıl etkiyi iskemi sonrası meydana gelen penumbra bölgesine göstermektedir. HBO tedavisiyle arteryel oksijen basıncının artmasının yanı sıra oksijen bakımından da zengin kanın penumbra bölgesine ulaştırılması; hasarlı beyin alanındaki oksijen seviyesini %20 oranında arttırmaktadır (51). Travmatik beyin hasarı çalışmalarına bakıldığında da HBO tedavisinin beyin dokusundaki  $pO_2$ 'i ve metabolik  $O_2$  oranını arttırdığı, beyindeki laktat ve piruvat düzeylerini düşürdüğü ve mitokondri fonksiyonlarını geliştirdiği gösterilmiştir (52, 53). Son yıllarda yapılan çalışmalar, HBO tedavisinin de HBO tedavisi ile aynı etkiye sahip olduğu gösterildi. Yapılan ön çalışmalarda MR spektroskopisi kullanılarak elde edilen veriler HBO tedavisinin inme sonrası hasarlı bölgelerde laktat seviyesini arttırarak iyileşmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (42, 54). Ayrıca HBO tedavisi, beyin travması sonrası beyindeki laktat ve piruvat düzeylerini ayarlayarak intrakranial basıncın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (55).

Literatürde yapılan son çalışmalar HBO tedavisinin anti-inflamatuvar etkisinin olduğunu göstermiştir (56). Kemirgenlerde uygulanan iskemi modellerinde; HBO uygulaması cyclooxygenase-2'i mRNA ve protein seviyesinde düşürdüğü ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (57). I/R modeli kullanılan çalışmalarda hücre içi adhesion-molecule-1 azalttığı ve eNOS

mekanizmasını tetikleyerek polimorfonükleer nötrofil seviyesini düşürmektedir. Ayrıca HBO tedavisi programlı hücre ölümü sinyal yolağı olan apoptozu engellemektedir (58). I/R modelinde HBO birçok apoptoz öncüsü geni; HIF1-alfa, p53, kaspaz-9 ve kaspaz-3 seviyesini düşürmektedir (58-60). Hücre içi bu genlerin seviyelerinin düşmesi sonucu neonatal hipoksi, beyin travması ve beyin felci gibi patofizyolojik süreçlerde nörolojik olarak daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (58, 61). HBO kan viskozitesinin düşürür, trombosit agöçünü azaltır ve beyin kan akımını artırır. HBO tedavisi hakkında en büyük endişe duyulacak nokta vazokonstrüksiyonu tetikleyerek iskemiye daha da kötüleştirir (62). HBO tedavisinin nöroprotektif, vazokonstriktif ve anti-inflamatuar etkilerinin, hücre ölümünü önlediğı, kan-beyin bariyeri bütünlüğünü koruduğı ve vasküler geçirgenliğı azalttığı ve sitotoksik ve vazojenik beyin ödeminde azalmaya katkıda bulunduğı düşünülmektedir (62, 63).

### 4.3. Melatonin

Bilinen en eski biyo-sinyal moleküllerinden melatonin (N-asetil-5-metoksi triptamin) epifiz bezinin pineolasit adı verilen hücrelerinden üretilmektedir (Şekil 4.2.1.). Doğal bir nörotransmitter olan melatonin, memelilerin yanı sıra bitkiler tarafından da kullanılmaktadır (64, 65). Bunlara ek olarak melatonin hormonu lenfosit, kemik iliğı ve retina gibi birçok dokuda da parakrin etki göstererek kullanılmaktadır (66, 67).

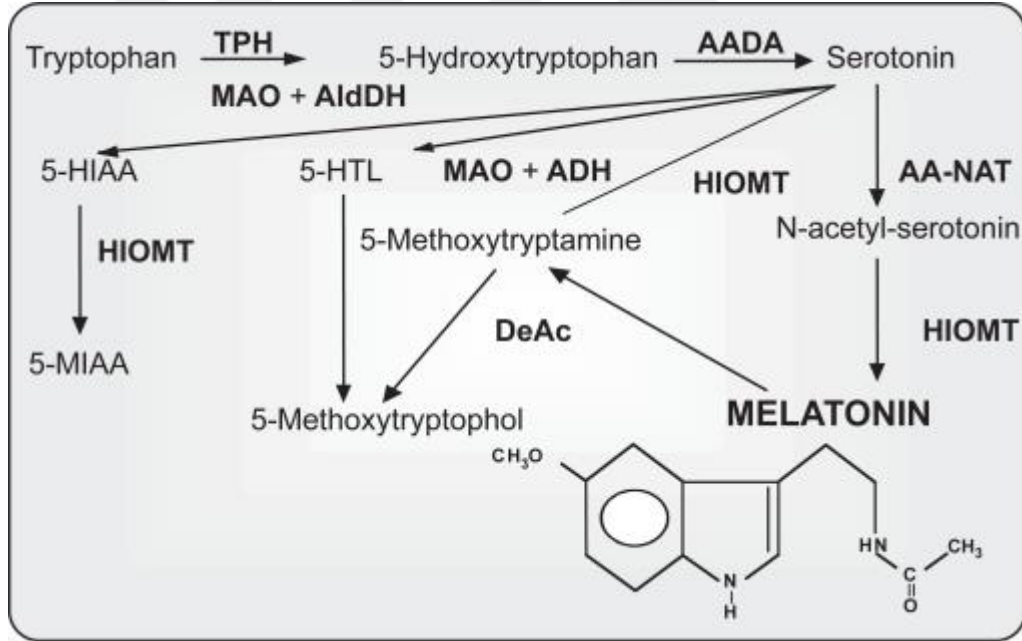


Şekil 4.3.1. Melatoninin moleküler formülü (N-asetil 5-metoksi triptamin).



### 4.3.1. Melatonin sentezi

Melatonin öncülerinden dört adımlı bir yol izleyerek sentezlenmektedir (Şekil 4.2.1.). Triptofan kan damarları tarafından emilir ve tüm vücutta sirkülasyona katılmaktadır. Pineal bez içerisinde Triptofan 5-Hidroksilaz (TPOH) ile mitokondride 5-hidroksi-trp'ye hidroksitlenir sonrasında pinealin sitozolünde 5-Hidroksi-L-Triptofan dekarboksilaz (AADC) ile dekarboksile edilmektedir. Sentezlenen bu bileşik serotonin adında bir başka önemli nörotransmitterdir (68, 69). Sentezlenen serotonin kullanılabilir veya melatonin sentezine devam edebilmektedir. Ayrıca serotonin başka metabolik sinyal yollarında kullanılabilir. Melatonin sentezi için 5-HT serbest amine grubundan Arylalkylamine N asetil transferaz (AANAT) asitle edilmektedir. Sonrasında O- gurubu hidroksil grubundan Asetil-serotonin o-metil transferaz (ASMT) tarafından metillenerek son ürün olan melatonin sentezlenmektedir (Şekil 4.3.1.).



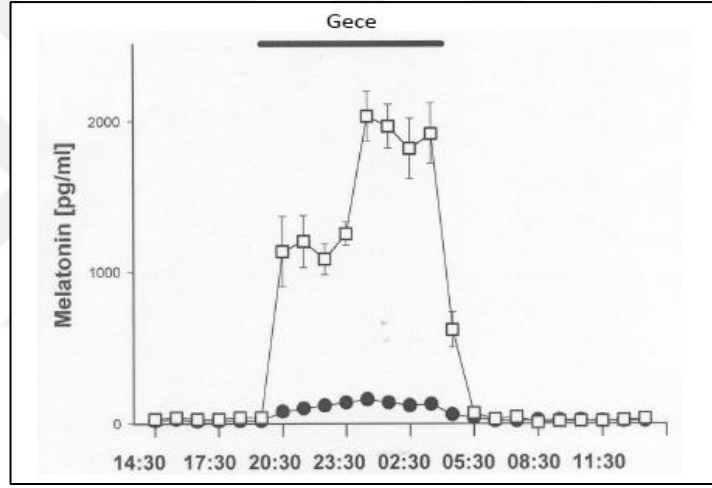
Şekil 4.3.1.1. Melatonin sentezi (70).

Melatoninin kan dolaşımında yarı-ömrü yaklaşık olarak 20 dk olarak bilinmektedir. Yarı-ömrünün kısa olmasından dolayı depolanmak yerine direkt olarak serbestlenebilme özelliğine sahiptir (71). Triptofan hidroksilaz (AAAD) ve hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzim aktiviteleri gece karanlığı ile

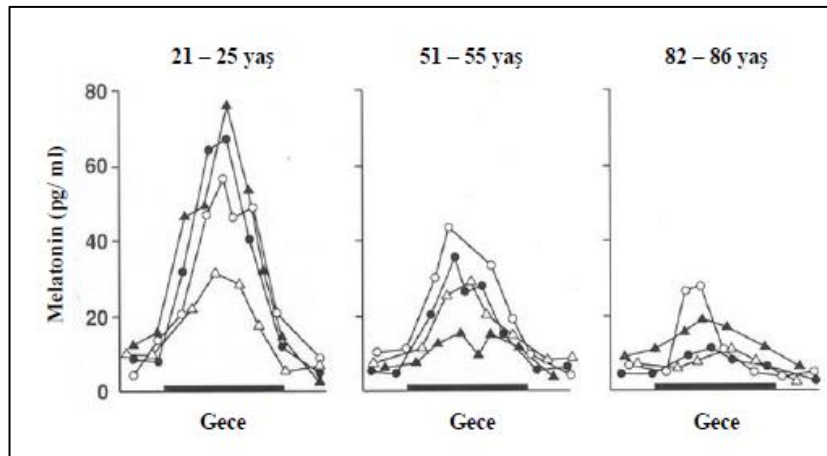
artarken, TPOH enzimi gece karanlığı ile beraber artmamaktadır. Bunun yanı sıra AANAT sirkadiyen ritim tarafından kontrol edilmektedir (72, 73).

#### 4.3.2. Melatonin üretimi ve düzenlenmesi

Sirkadiyen ritme bağlı olarak üretilmesi kontrol edilen melatonin hormonu yine aynı şekilde biyolojik ritmin düzenlenmesini de kontrol etmektedir. Sirkadiyen ritim ile beraber artan melatonin vücut içerisinde homeostazın korunmasını sağlayan önemli hormonlardan biri olarak bilinmektedir. Melatonin üretimi gün içerisinde biyolojik saate bağlı olarak değişmesinin yanı sıra cinsiyet ve yaşa göre de değişmektedir (Şekil 4.3.2.1.). Yaşlanmaya bağlı olarak pineal bezde görülen fizyolojik değişimler nedeniyle melatonin üretim seviyesi de azalmaktadır (Şekil 4.3.2.2.).



Şekil 4.3.2.1. Melatonin hormonunun sirkadiyen ritme bağlı üretimi. Bubunik ve ark. 2011 çalışmasından adapte edilmiştir (74).



Şekil 4.3.2.2. Melatonin hormonunun yaşlanmaya bağlı üretimi. Bubunik ve ark. 2011 çalışmasından adapte edilmiştir (74).

Melatonin salgılanması ışığa duyarlı olan pinealosit hücreleri tarafından düzenlenmektedir. Böylece ışık nedeniyle engellenen melatonin üretimi karanlık evrede artmaktadır. Melatonin üretimi gece saatleri 20:00 - 21:00 saatleri arasında artmaya başlar ve gece 01:00 - 03:00 arasında üretim maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Sabah saat 05:00 - 07:00 arasında üretimi giderek azalarak ve bazal seviyeye düşmektedir (75, 76).

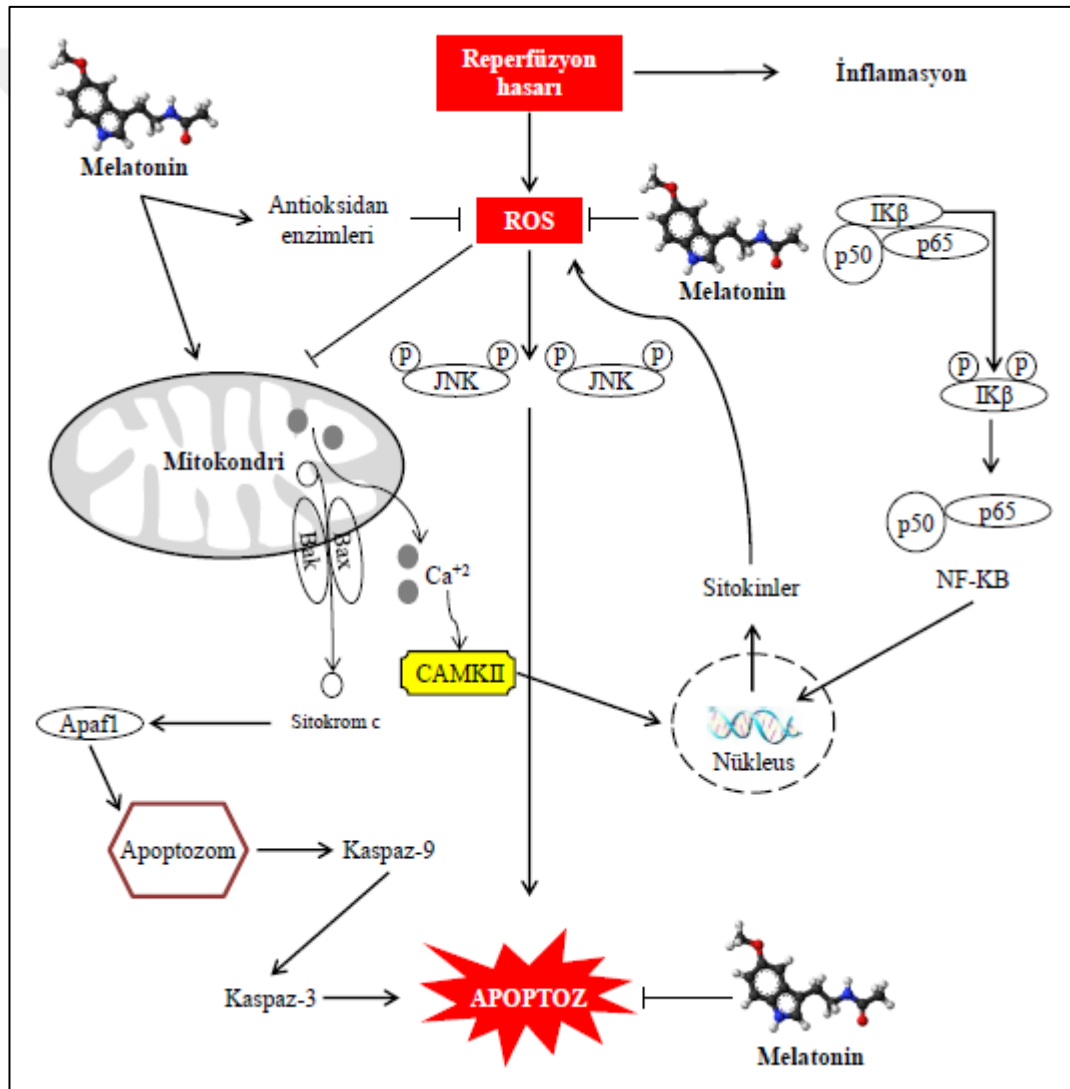
Melatonin üretiminin biyolojik saate bağlı gerçekleştiği ve nokturnal bir döngü izlediği bilinmektedir. Beyinde biyolojik ritmin devamlılığında sorumlu merkez olan suprakiazmatik nükleus (SKN) pineal bezden melatonin salınımını da kontrol etmektedir. İskemi sonrası gerçekleşen patolojik süreçte SKN ve SKN'a bağlı işleyen periferik saatlerde (hipokampus, korteks ve striatumda) regülasyonun bozulduğu ve sonuç olarak melatonin salınımında düzensizlikler gerçekleştiği düşünülmektedir (77). Yapılan insan çalışmalarına göre beyin felci sonrasında hem akut faz (3 gün-post operasyon) hem de kronik fazda (2 hafta-post operasyon) plazmadaki ve üredeki melatonin seviyesinin azaldığı ve pineal bezden melatonin salınımının normal ritminin dışına çıktığı gösterilmiştir (78-80). Başka bir çalışmada ise mikro-diyaliz yöntemi ile pineal bezde üretilen melatonin miktarları belirlenmiş, iskemi sonrası melatonin salınım periyodunun kaydığı ve uzadığı gösterilmiştir (81).

#### **4.3.3. Melatoninin patofizyolojik süreçlerdeki rolü**

Melatonin hormonunun özellikle nörodejeneratif hastalıklardaki nöroprotektif etkisi bilinmektedir (82-84). Ekzojenik olarak uygulanan melatoninin nörogenezi arttırdığı ve beyin hasarı sonrası rejenerasyonda etkili olduğu bilinmektedir. İskemi sonrası melatonin tedavisinin hem akut fazda hem de uzun dönemde iyileştirici etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (66, 85). Ayrıca, endojenik melatonin sekresyonunun da nörogenez ve hücre sağkalımı üzerinde olumlu etkisi olduğu, sinirsel hasarlanmaya karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (86, 87). Patolojik durumlarda da fizyolojik melatonin üretiminin hasar alanını azalttığı pinealektomi yapılan hayvanlarda iyileşme sürecinin uzadığı gösterilmiştir (88).

Hipoksi ve reperfüzyon esnasında yüksek miktarda NOS ve reaktif azot türlerinin üretimi söz konusudur (Şekil 4.3.3.1.). Bu toksik ajanlar sitosol içerisine

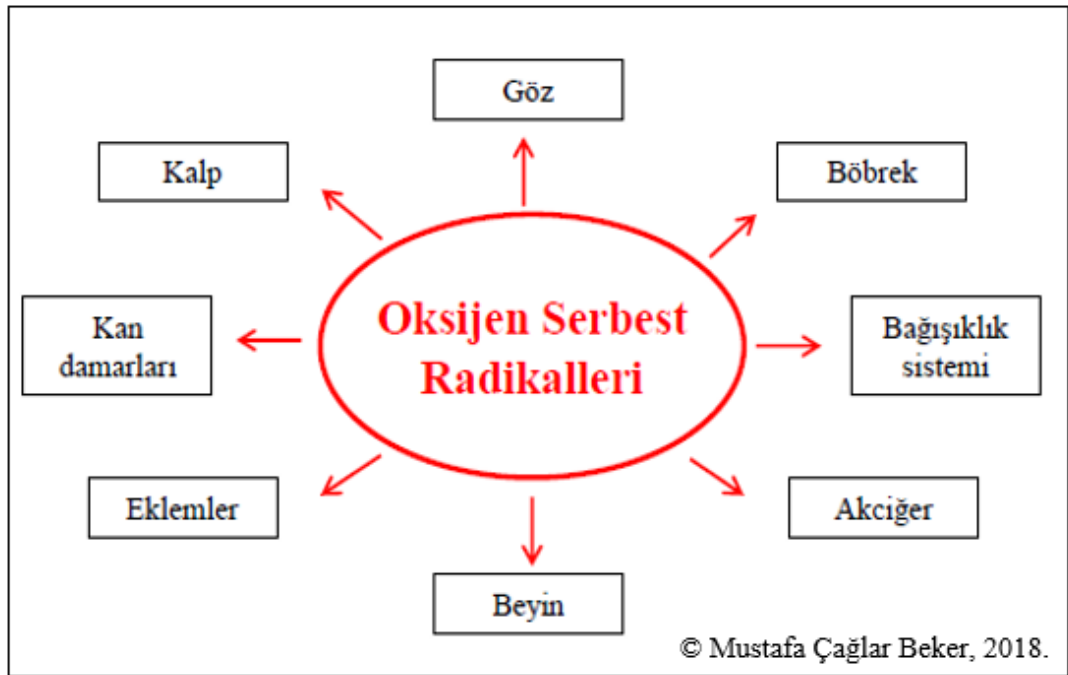
kalsiyum salınmasına ve mitokondriye zarar vererek sitokrom c nin salınmasına neden olmaktadır. Serbestleşen sitokrom c apoptoz sinyal yolağının tetiklenmesine neden olmaktadır. Hipoksi ve tekrardan oksijenlenme ayrıca NF-KB'nin serbestleştirilmesine ve bunun hücre çekirdeğine translokasyonuna neden olan enflamatuar bir yanıtı neden olmaktadır. Sitokinlerin aktifleşmesi ile ROS üretimi daha da güçlenmektedir. Melatoninin ROS aktivasyonunu azalttığı literatürde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (89-91). Bu çalışmalarda serbest oksijen radikal yakalayıcı melatoninin apoptotik hücre ölümünü ve gelişen hasar mekanizmalarını azalttığı gösterilmiştir (90, 91).



Şekil 4.3.3.1. Melatoninin iske mi/ reperfüzyon sırasında görülen patofizyolojik süreçlere olan etkilerinin şematik olarak gösterimi. Joshi ve ark. 2015 yılındaki çalışmasından adapte edilmiştir (92).

#### 4.3.4. Melatoninin antioksidan özellikleri

Önemli bir sinyal molekülü olmasının yanında melatonin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) zararlı etkilerini nötralize edebilen çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir (Şekil 4.3.4.1.) (93). Melatoninin, serbest radikal yakalayıcısı özelliğiyle bir hücredeki anti-oksidatif kapasiteyi gösteren doğal bir referans molekül olan vitamin E'den bile daha kuvvetli bir antioksidan olduğu düşünülmektedir (94). Melatonin çoğu antioksidan moleküllerinin aksine yalnızca serbest radikal yakalamaz, bu göreve ek olarak antioksidan enzimlerinin ekspresyonunu tetikler ve öncül oksidatif enzimlerini inhibe eder (95, 96). Melatoninin hücre içerisinde seviyelerini arttırdığı antioksidatif enzimler arasında mitokondriyel ve sitozolik süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz bulunmaktadır. Bunların yanında melatonin nöronal ve indüklenebilir NOS (iNOS) enzimleri gibi hücre ölümü mekanizmalarında rolü olan enzimlerin miktarlarını da düşürdüğü yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (97, 98).



Şekil 4.3.4.1. Oksijen serbest radikallerinin etkilediği sistemler.

Melatonin; hidroksil (-OH), karbon trioksit (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>) ve peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) moleküllerini direkt olarak

bağlayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (93, 99, 100). Melatonin serbest radikallerle girdiği enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda cyclic 3-hydroxymelatonin ve kynuramine türevleri olan N1-asetil-N2- formil-5-metoksi knüramin (AFMK) ve N1-asetil 5- metoksi küramin (AMK) moleküllerine dönüşebilmektedir. Melatoninin kynuramine türevi metabolitleri AFMK ve AMK'nın da ayrıca antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında melatonin ve metaboliti olan AMK molekülü mitokondride, serbest radikal oluşumunu engelleyerek ATP üretim verimini arttıran tek elektron transfer reaksiyonlarında elektron donorü olarak hareket edebilme kapasitesine sahiptir (101).

#### **4.3.5. Melatoninin iskemi/ reperfüzyon hasarındaki rolü**

Melatonin hem su hem de yağda yüksek çözünme gücüne sahiptir, bu yüzden KBB'ni geçebilme potansiyeli oldukça yüksek bir moleküldür. Damar içi enjeksiyonunun ardından plazmadaki ve beyindeki yarılanma ömrünün etkili seviyelerde olması, hücre içerisindeki iyi dağılımı ve toksik özellikleri olmaması sebebiyle melatonin beyin felci gibi hastalıkların tedavisinde aday bir nöroprotektif molekül olarak umut vericidir (102).

Melatonin, en fazla epifiz bezi tarafından olmakla birlikte vücutta farklı noktalarda üretilmektedir. Bu yüzden fizyolojik olarak salgılanan melatoninin iskemi/ reperfüzyon (I/R) hasarı üzerine etkileri *in vivo* hayvan modellerinde çalışılmıştır (103, 104). Bu deneylerde, epifiz bezleri çıkartılmış hayvanlarda beyin felci modeli geliştirilmiş ve nörodejenerasyonun, melatonin üretemeyen hayvanların beyinlerinde kontrol hayvanlarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, melatonin tedavisinin beyindeki I/R hasarına etkisi sıçan (104, 105), Moğol gerbili (106), fare (66, 107) ve kedi (108) gibi farklı model organizmalarda araştırılmıştır ve tedavinin hasar alanını düşürdüğü gösterilmiştir. İskemi modellerinde uygulanan melatonin tedavisi uygulanan doza göre çeşitlilik göstermektedir. Kullanılan melatonin dozu 2.5 mg/ kg ile 40 mg/ kg arasında değişiklik gösterebildiği gibi literatürde melatoninin veriliş şekilleri açısından tek veya düzenli aralıklarla enjeksiyon, uygulama zamanı açısından da beyin felcinden 1 saat önce veya 2 saat sonra olmak üzere farklı varyasyonları mevcuttur (104, 109, 110).

Hasar alanını azaltması ve nöronal sağkalımı arttırması dışında, oral, intravenöz veya periton içi enjeksiyon yoluyla uygulanan melatoninin nöroprotektif etkisinin ardındaki moleküler mekanizmanın aydınlatılması için farklı hayvan modelleri kullanılmıştır (111, 112). Moğol gerbillerinde yapılan bir çalışmada geçici fokal serebral iskemi modeli uygulanan hayvanlarda melatonin tedavisinin NO ve cGMP miktarlarının artmasına engel olurken, peroksinitrit üretim indikatörü olan nitrotrizin seviyesinin, DNA hasar ve ATP tüketim indikatörü olan PARP aktivitesinin ve lipid peroksidasyon indikatörü olan malondialdehit seviyesinin azalmasına sebep olduğu bulunmuştur (113). Ayrıca orta serebral arter (OSA) tıkanması ile oluşturulan beyin felci modeli sıçanlarda malondialdehit ve glutatyon seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (114).

Global iskemik sıçan modelinde melatonin muamelesinin iskemiye bağlı olarak azalan SOD ve glutatyon redüktaz enzimlerini arttırdığı rapor edilmiştir (115). Ek olarak, geçici iskemi modelinde melatonin öncül sağkalım proteini Bcl-2 ve DNA tamir mekanizmasında görevli bir protein olan ERCC6'nin üretimlerini teşvik ettiği bilinmektedir (115). Fosforile Akt seviyelerinin hem beyin felcinden önce hem de beyin felcinden sonra akut olarak uygulanan melatonine bağlı olarak arttığı ancak ERK-1/-2 ve Jun kinaz-1/-2 seviyelerinin yalnızca beyin felcinden önce yapılan melatonin uygulamasıyla arttığı gösterilmiştir (86).

Ayrıca melatonin, beyin felci hastalarını tedavi etmek için kullanılan tPA'nın kötü etkilerini iNOS seviyesini azaltarak yok ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (116). Diğer bir çalışmada ise melatonin tedavisinin benzer şekilde iNOS seviyesinde azalmaya neden olmasına rağmen, beyin felci sonrası hasara bağlı olarak tetiklenen endotelial NOS (eNOS) seviyesindeki düşüşü engellediğini belirtmektedir (117).

Yapılan sistemik bir analize göre, uygulanan melatoninin etkinliğinin I/R hasarına karşı %42,8 iyileşme sağladığı ve etkin melatonin dozajının 5 mg/ kg'dan yüksek oranlar olduğu bulunmuştur (118). Melatoninin nöroprotektif aktivitesi beyin felcinden önce koruyucu olarak uygulandığında (119, 120), beyin felcinden sonra kısa aralıklarla uygulandığında (118) veya beyin felcinden 24 saat sonra devamlı ve düzenli şekilde uygulandığında gözlenebilmektedir (121).

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Deney Grupları

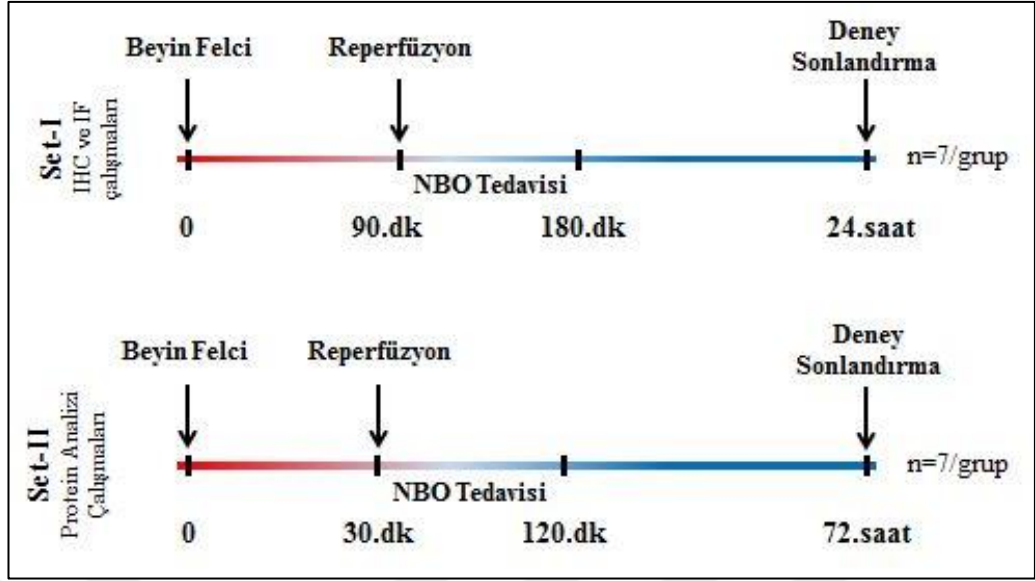
Bu çalışma etik standartlara, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmış olup İstanbul Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından da onaylanmıştır. Çalışmada 8-12 haftalık erkek Balb/c fareleri kullanılmıştır. Beyin felci sonrası NBO tedavisinin tek başına veya 4 mg/ kg melatonin ile kombinasyonun etkisini araştırabilmek için 6 farklı deney grubu, 3 farklı deney seti yapılmıştır.

Gruplar;

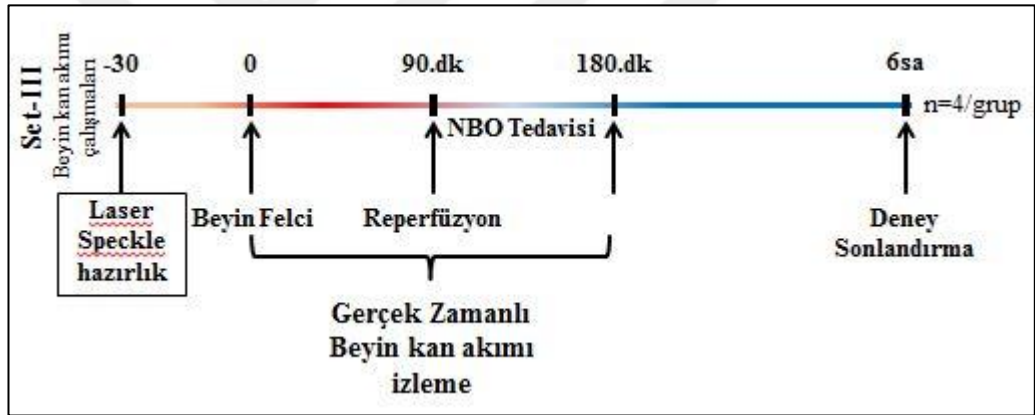
- %21 NBO tedavisi + kontrol enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol).
- %21 NBO tedavisi + 4 mg/ kg melatonin enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol içerisinde 4 mg/ kg dozunda melatonin).
- %70 NBO tedavisi + kontrol enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol).
- %70 NBO tedavisi + 4 mg/ kg melatonin enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol içerisinde 4 mg/ kg dozunda melatonin).
- %100 NBO tedavisi + kontrol enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol).
- %100 NBO tedavisi + 4 mg/ kg melatonin enjeksiyonu (50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş %5 etanol içerisinde 4 mg/ kg dozunda melatonin).

NBO tedavisinin tek başına veya 4 mg/ kg melatonin ile kombinasyonunun beyin felci sonrası nörolojik duruma, hasar alanına, beyin ödeme ve KBB geçirgenliğine olan etkilerini incelemek için 90 dk OSA tıkanması sonrası 24 saatlik reperfüzyon deney seti yapılmıştır (n=7/ grup). NBO tedavisinin tek başına veya 4 mg/ kg melatonin ile kombinasyonunun beyin felci sonrası apoptotik hücre ölümü üzerine etkilerinin incelenmesi için 30 dk OSA tıkanması takiben 72 saatlik reperfüzyon deney seti yapılmıştır (n=7/ grup) (Şekil 5.1.1.). NBO tedavisinin beyin mikrodolaşımı üzerine etkilerinin incelenmesi için 90 dk OSA tıkanması takiben 6 saat reperfüzyon deney seti yapılmıştır (n=4/ grup) (Şekil 5.1.2.).





Şekil 5.1.1. 90 dk ve 30 dk OSA tıkanması deney dizaynı.



Şekil 5.1.2. Lazer Speckle görüntüleme tekniği deney dizaynı.

## 5.2. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli

20-25 gr ağırlığındaki erkek Balb/C fareler %1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O<sub>2</sub>, kalanı N<sub>2</sub>O) ile anesteziye (Resim 5.2.1.) alındıktan sonra vücut sıcaklıkları homeotermik ısıtma sistemiyle (55-7020, Harvard Apparatus, Amerika Birleşik Devletleri) 36,5-37,0°C arasında tutulmuştur. Beyin felci operasyonları ve reperfüzyonun kontrolü amacıyla beyin kan akımını anlık ölçen Lazer Doppler' in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, İsveç) OSA (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direkt kafatası kemiği üzerine yerleştirilerek kontrol edilmiştir (Resim 5.2.2.). Fokal serebral iskemi metodu intraluminal teknik ile

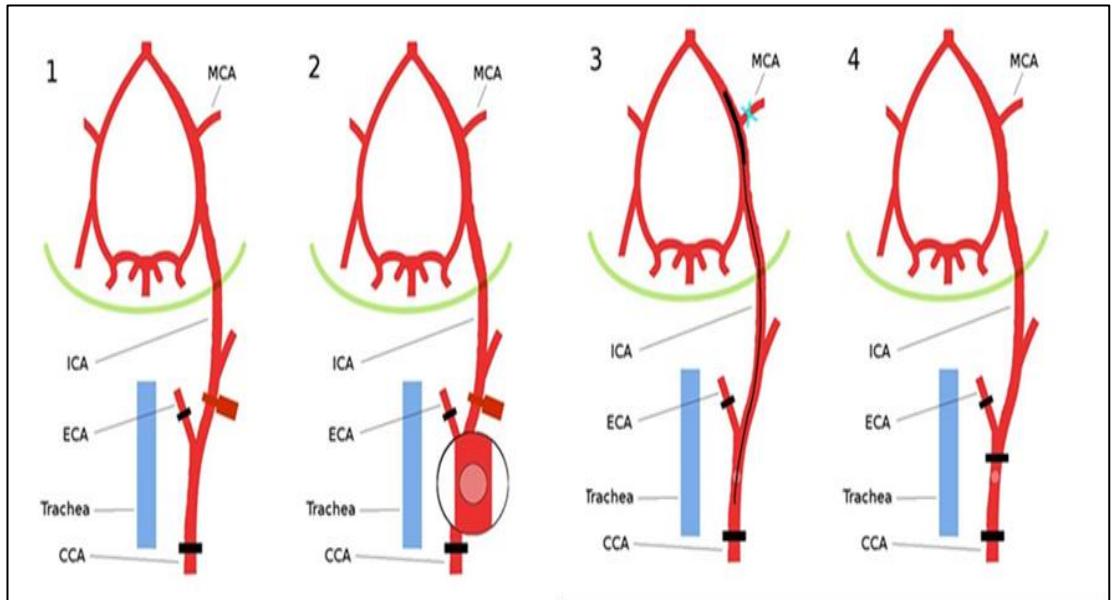
yapılmıştır. Boyun üzerine deriye yapılan küçük bir kesi sonrası, sol common ve external karotid arterler izole edildikten sonra 7,0 ipek dikiş ipliğiyle bağlanıp, bir mikrovasküler klips (FE691, Aesculap, Almanya) internal karotid arter üzerine yerleştirilmiştir. Orta serebral arterin tıkanması amacıyla 8,0 naylon monofilament (Ethilon; Ethicon, Almanya) silikon ile kaplanarak (Xantopren, Bayer Dental, Japonya) çapı 180-190 µm'ye çıkarılmıştır. Common karotid artere küçük bir kesik yapılarak silikon ile kaplı daha önceden hazırlanmış olan filament birurkasyo karotikumdan itibaren direnç hissedilinceye kadar internal karotid arter içerisinde yaklaşık 9 mm distal yönde ilerletilmiştir (Şekil 5.2.1.). 30 dakika veya 90 dk sonra silikon kaplı filament geri çekilerek reperfüzyon başlatılmıştır. Reperfüzyonun kontrolü amacıyla LDF kayıtları 1 dakika süresince izlenmiştir. Açılan yara 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğan, Türkiye) ile kapatıldıktan sonra anesteziye son verilerek fareler gruplarında belirtilen O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına bağlı olarak tedavi kafeslerine alınmışlardır.



**Resim 5.2.1.** İzofloran gaz anestezi sistemi ve oksijen sensörü.



Resim 5.2.2. Beyin felci operasyon masası.



Şekil.5.2.1. Deneysel OSA tıkanması metodu.

### **5.3. Melatonin ve Taşıyıcı Enjeksiyonlarının Uygulanması**

Beyin felci operasyonu sonrasında reperfüzyonun hemen başlangıcında hayvanlara periton içi enjeksiyon ile melatonin (M5250, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) veya melatoninin çözücüsü olan taşıyıcı enjeksiyonu uygulanmıştır. Melatonin tedavisi alan her hayvanın ağırlığına göre 4 mg/ kg dozunda melatonin 50 µl %0.9 sodyum klorür (Biofleks, Osel, Türkiye) içerisinde çözülmüş %5 etanol (100983, Merck, Amerika Birleşik Devletleri) içerisinde çözüldü ve periton içi enjeksiyon ile uygulanmıştır. Taşıyıcı grubuna 50 µl %0.9 sodyum klorür içerisinde çözülmüş % 5 etanol enjeksiyonu periton içi enjeksiyon ile uygulanmıştır.

### **5.4. NBO Tedavisinin Uygulanması**

Beyin felci operasyonundan hemen sonra rastgele bir şekilde melatonin veya kontrol enjeksiyonu yapılan fareler %21 NBO, %70 NBO veya %100 NBO tedavileri için özel olarak tasarlanmış oksijen uygulama kabinlerine alınmıştır. 25 cm çapında cam desikatör (I.039.01.250, Isolab, Türkiye) içerisine alınan hayvanların vücut sıcaklıkları homeotermik ısıtma sistemiyle (55-7020, Harvard Apparatus, Amerika Birleşik Devletleri) gerçek zamanlı olarak izlenmiş ve 36,5-37,0°C arasında tutulmuştur. Tedavi süresince oksijen uygulama kabinlerindeki basınç manometre (Oxyflow-01, Firstmed, Amerika Birleşik Devletleri) yardımıyla, oksijen konsantrasyonu ise oksijen sensörleri (MX-300, Teledyne Analytical Instruments, Amerika Birleşik Devletleri) vasıtasıyla gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Deneyler süresince NBO basıncı 1 ATA ve oksijen konsantrasyonları tedavi gruplarına göre %21, %70 veya %100 olacak şekilde ayarlanmıştır.

### **5.5. Nörolojik Skorlama**

90 dk OSA oklüzyonu takiben 24 saat reperfüzyon uygulanan fareler sakrifiye edilmeden hemen önce nörolojik durumlarına göre puanlama yapılmıştır. Farelerin durumlarına göre uygulanan skorlama kriterleri aşağıda belirtilmiştir;

0 = Normal fonksiyon,

1 = Kuyruktan kaldırılınca kontralateral taraftaki eli çekme,

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

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

4 = Herhangi bir motor aktivite olmadığı zaman.

### 5.6. Cryostat Cihazı ile Beyin Kesimi

30 dk veya 90 dk OSA tıkanması sonrası 72 saat veya 24 saat reperfüzyon uygulanan fareler yüksek doz izofloran anestezisi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Beyinler hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra kurubuz üzerinde dondurulmuştur. Beyinler Cryostat (CM1950, Leica, Almanya) cihazı kullanılarak kesilmiştir (Resim 5.6.1.). 30 dakika beyin felci geçiren hayvanların beyinlerinden immünfloresan boyamalar için striatum seviyesinden (Bregma 0) 18 µm kalınlığında kesitler pozitif yüklü lamlar üzerine alınmıştır. 90 dk beyin felci takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerin beyinlerinden immünhistokimyasal boyamalar için 2mm aralıklarla (bregmadan 2mm kaudal ve 2 mm rostral) kesitler ve protein analizi çalışmaları için striatum seviyesinden doku alınmıştır.



**Resim 5.6.1.** Cryostat cihazı.

## 5.7. TUNEL Boyaması

DNA fragmantasyonu analizi için terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL, 11684795910, Roche, Amerika) kiti kullanılmıştır. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon yapılan farelerin striatum seviyesinden alınan beyin kesitleri %4'lük paraformaldehit (PFA) ile fikse edildikten sonra 3 kere 5 dk süresince 0.1 M fosfatlanmış tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanmış ve PFA kalıntısından arındırılmıştır. Bloklama işlemi normal keçi serumu (NGS, G9023, Sigma Aldrich, ABD) ile yapıldıktan sonra örnekler 30 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerin üzerine TUNEL karışımı eklenerek 60 dk süresince 37°C' de inkübe edilmiştir. TUNEL reaksiyonunu durdurmak için inkübasyon sonunda örnekler 3 kere 5 dk süresince 0.1 M PSB ile yıkanmıştır. Son olarak hücre çekirdeklerini görüntüleyebilmek için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) ile çekirdek boyaması yapılmıştır ve örnekler sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Örneklerin analizi konfokal mikroskop (LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Almanya) kullanılarak yapılmıştır (Resim 5.7.1.).



**Resim 5.7.1.** Konfokal mikroskobu.

## 5.8. Cresyl Violet Boyaması

Cresyl Violet boyaması için 1.63 gr sodyum asetat (32319, Sigma-Aldrich) 60 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra 237.1 ml dH<sub>2</sub>O içerisine 2.9 ml asetik asit (%100 Merck bulunan solüsyonun üzerine eklenerek karıştırılmıştır. pH 4.0 olacak şekilde ayarlanan solüsyonun üzerine 1.5 gram Cresyl violet acetate (C5042-106, Sigma Aldrich) eklenmiştir. Karışım bir gece süresince çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra ertesi gün filtreden geçirilip kullanıma hazırlanmıştır.

90 dk OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerden 2 mm aralıklarla alınan 18 µm kalınlığındaki beyinlere Cresyl violet boyaması yapılmıştır 37°C de 30 dakika bekletilen örnekler 7 dakika %4 PFA (158127; Sigma-Aldrich) ile fiksasyon yapıldıktan sonra 3 kere PBS ile 5 dakika süresince çalkalayıcı (Unimax 1010; Heidolph) üzerinde yıkanmıştır. Örnekler daha sonra 15 dakika süresince Cresyl Violet solüsyonu içerisinde, çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Boyamadan çıkan örnekler dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra sırasıyla %70 etanol (24102, Sigma-Aldrich), %90 etanol, %95 etanol ve %100 etanolde 15 saniye bekletilerek cresyl violet boyasının renginin açılması sağlanmıştır. Alkol serisinden sonra örnekler ksilen (108684, Merck) solüsyonuna alınmıştır ve en az 3 dk süresince bekletilen örnekler entellan (M1289, Sigma-Aldrich) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır.

## 5.9. İmmunoglobulin G Boyaması

İmmunoglobulin (IgG) boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent, R.T.U.(pk-7100, Vector Laboratories, Amerika Birleşik Devletleri) kiti kullanılmıştır. 90 dk OSA tıkanması metodu takiben 24 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin striatum seviyesinden alınan koronal kesitler 15 dk süresince %4 PFA ile fikse edilmiştir. Sonrasından PFA'dan kurtulmak için örnekler 0.1 M PBS ile 3 kere 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. 30 dk süresince oda sıcaklığında %0.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren metanol içerisinde inkübe edilen örnekler 0.1 M PBS ile 3 kere 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Bloklama işlemi normal at serumu (NHS, vectostain) kullanılarak 10 dk süresince oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Örnekler 0.1 M PBS ile 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde yıkandıktan sonra örneklerin üzerine biyotinlenmiş ikincil antikor eklenerek 10 dk süresince çalkalayıcı üzerinde inkübe

edilmiştir. Sonrasında örnekler 0.1 M PBS ile 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. 5 dk streptavidin/ peroksidaz kompleksi ile muamele edilen örnekler sonrasında tekrardan 0.1 M PBS ile 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Kit içerisinde çıkan solüsyonlarla kullanıma kılavuzundaki talimatlar izlenerek DAB substrat solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 2.5 ml dH<sub>2</sub>O için 1 damla stok tampon solüsyonu, 2 damla DAB stok solüsyonu ve 1 damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu eklenerek iyice karıştırılması sağlanmıştır. Örneklerin üzerine DAB substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatılmış ve yaklaşık olarak 90 sn sonunda reaksiyon soğuk 0.1 M PBS ile durdurulmuştur. Örnekler sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır.

## **5.10. Western Blot Protein Analizi**

### **5.10.1. Protein izolasyonu**

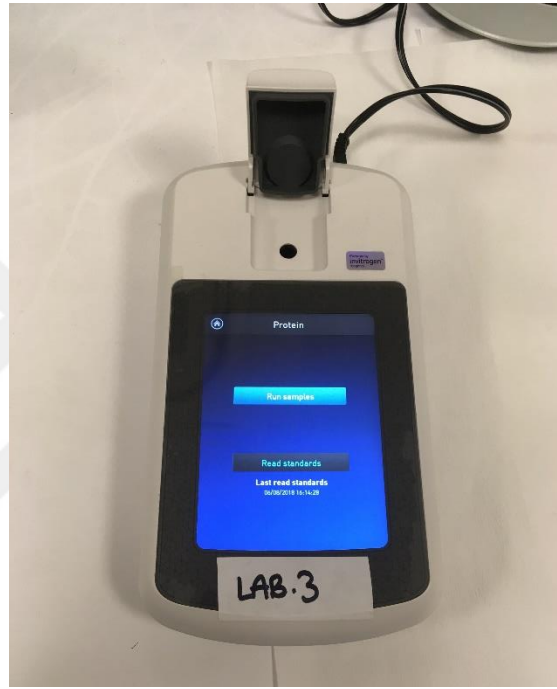
Protein izolasyonu için 90 dk iskemiden 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyinlerinden cryostat cihazı kullanılarak Bregma 0 noktasından doku örnekleri alınmıştır. Aynı gruptaki örnekler bir araya getirilerek protein izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin üzerine proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5782, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) ilave edilmiş olan ripa tampon çözeltisi (R0278-50ML, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklenmiş ve örnekler homojenize edilmiştir.

### **5.10.2. Protein konsantrasyonu ölçümü**

Örneklerin protein konsantrasyonları Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen Life Technologies Corporation, Amerika Birleşik Devletleri), ve Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen Life Technologies Corporation, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak hesaplanmıştır. Protein ölçümü yapılacak olan 6 farklı grup (%21 O<sub>2</sub> + taşıyıcı veya melatonin, %70 O<sub>2</sub> + taşıyıcı veya melatonin, %100 O<sub>2</sub> + taşıyıcı veya melatonin) ve Qubit cihazının kalibrasyonunun yapılması için kullanılan 3 farklı standart solüsyonu olmak üzere toplam 9 örnek için tampon solüsyonu hazırlanmıştır. Qubit protein analiz kitinden çıkan Qubit protein tamponundan 1791 µl alınmış ve üzerine yine aynı kit içerisinde çıkan Qubit bileşiminden 9 µl



eklenmiştir. Kalibrasyon için kullanılacak olan standart 1, standart 2 ve standart 3 tüplerine 190 µl tampon solüsyonu eklendikten sonra üzerlerine 10 µl standart çözeltilerinden eklenmiştir. Protein ölçümü yapılacak olan 6 farklı örneğin her biri için 198 µl tampon çözeltisi ve üzerlerine 2 µl protein örneği konulmuştur. Örnekler 2-3 saniye vorteks yapıldıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında Qubit 3.0 cihazı kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır (Resim 5.10.2.1.).



**Resim 5.10.2.1.** Qubit protein ölçüm cihazı.

### **5.10.3. Jel elektroforezi**

Protein konsantrasyonu belirlenen örneklerden (taşıyıcı veya melatonin enjeksiyonu yapılmış olan %21 NBO, %70 NBO veya %100 NBO) her biri için 20 µg protein karışımı, 2.5 ml 4X laemmlı tampon solüsyonu (161-0747, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) ve kalanı ddH<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlanan 10 µl protein karışımı 5 dk süresince 95°C’ de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler jel elektroforez yapılıncaya kadar +4°C buz üzerine alınmıştır.

4'lü dikey jel elektroforez tankı (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) içerisine mini-Protean TGX Precast protein jeli (4569033, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) yerleştirilmiştir. Dikey elektroforez için gerekli olan tampon çözeltisi (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) eklenmiştir. Protein örnekleri ve dikey elektroforezin süresini belirlemek için kullanılan protein işaretçisi Precision Plus Protein-All blue standards (163-0393, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) jel içerisine yüklenmiştir. Sonrasında güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak proteinlerin ağırlıklarına göre ayrıştırılması gerçekleştirilmiştir (Resim 5.10.3.1.).



**Resim 5.10.3.1.** Jel elektroforez sistemi.

#### **5.10.4. Jelden membrana protein transferi**

Elektroforez sonunda proteinler jelden PVDF (Poli-viniliden florür) membrana (162-0174, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) transfer edebilmek için transfer tampon solüsyonu (140-4272, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) hazırlanmıştır. PVDF membran ve filtre kâğıtları (162-0219,

Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika), hazırlanan transfer tampon solüsyonu içerisinde ısılatıldıktan sonra Trans-blot turbo transfer sistemi (1704155, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinler jelden PVDF membrana aktarımı sağlanmıştır (Resim 5.10.4.1.).



**Resim 5.10.4.1.** Trans-blot turbo transfer sistemi.

### **5.10.5. Antikorlar ile inkübasyon**

PDVF membranlar 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris saline) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) ile oda ısısında 1 saat bloklandıktan sonra TBS-T ile yıkanan membranlar bir gece poliklonal Akt (9272; Cell Signaling), poliklonal forforlanmış Akt (9271; Cell Signaling), monoklonal Bcl-xL (2764; Cell Signaling), poliklonal Bax (2772; Cell Signaling), monoklonal nNOS (Ab76067; Abcam), poliklonal iNOS (sc-650; Santa Cruz Biotechnology) ve poliklonal eNOS (Ab66127; Abcam) antikorları ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu içerisinde Horseradish Peroksidaz enzimi ekli olan ikincil antikor (31460; Thermo Scientific) ile muamele edilmiştir.

### 5.10.6. Görüntüleme ve değerlendirme

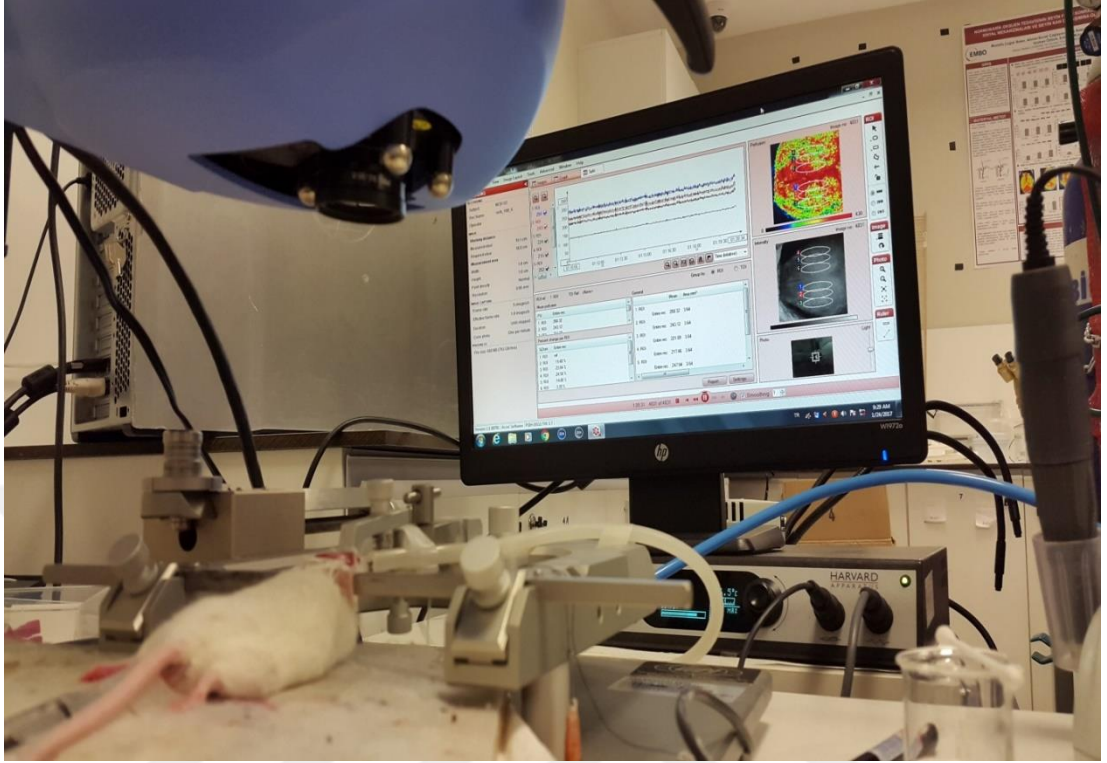
1 saat oda sıcaklığında inkübe edilen membranlar inkübasyon sonunda üç kere TBS-T ile yıkandıktan sonra 5 dakika ECL Western görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) ile inkübe edilen membranlar Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak proteinlerin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir (Resim 5.10.6.1.).



**Resim 5.10.6.1.** Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika)

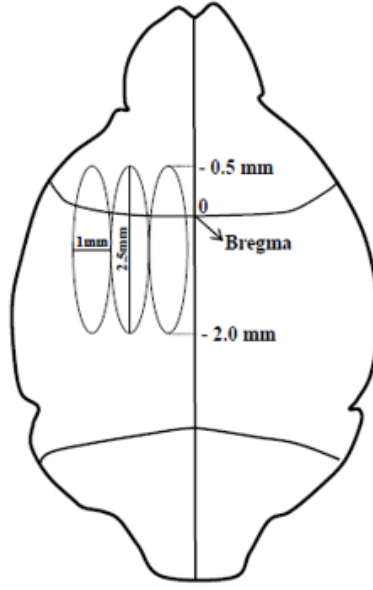
Western blot yöntemi ile elde edilen jel görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD, Amerika), yardımıyla analiz edilmiştir.

## 5.11. Lazer Speckle Görüntüleme Tekniği



**Resim. 5.11.1.** Lazer Speckle görüntüleme tekniği deney düzeneği.

OSA tıkanmasından 30 dk önce fareler %1 İzofluran (%30 O<sub>2</sub>, kalanı N<sub>2</sub>O) ile anesteziye alınmıştır. Stereotaksik frame yerleştirilen farelerin kafatası derisine yapılan ufak bir kesi sonrası kafatası kemikleri serum fizyolojik ile temizlenmiştir. Tur aleti (H37L1, Marathon, Kore) kullanılarak ipsilateral hemisfer ve kontralateral hemisferlerde beyin kan akımı ölçümü yapılacak olan bölgelerin kafatası kemikleri delinmiştir. Kafatası kemikleri operasyon süresince herhangi bir kanama olmaması için yerinden kaldırılmamıştır. 90 dk süresince OSA tıkanması yapılan farelere reperfüzyonun hemen başlangıcında periton içi enjeksiyon ile taşıyıcı veya melatonin enjeksiyonu yapılmıştır. İskemi sonrası bölgesel kanlanma 1 dk süresince LDF cihazı kullanılarak izlendikten sonra önceden delinmiş olan kafatası kemikleri kaldırılmıştır. Ölçüm yapılacak olan ipsilateral ve kontralateral beyin bölgeleri serum fizyolojik ile temizlendikten sonra fareler stereotaksik frame'e sabitlenmiştir. Farelere gruplarına göre %21, %70 veya %100 NBO uygulanmaya başlandıktan sonra Lazer Speckle (PeriCam PSI, Perimed, Stockholm, İsveç) cihazı ile gerçek zamanlı olarak bölgesel kan akımı takibi gerçekleştirilmiştir (Resim 5.11.1).



© Mustafa Çağlar Beker, 2018.

**Şekil 5.11.1.** Lazer Speckle görüntülemesinin yapıldığı iskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks seviyelerinin gösterimi.

Lazer Speckle cihazı kullanılarak kafatası üzerinden 10 cm yükseklikte olan CCD kamera vasıtasıyla anlık olarak görüntüler alınmıştır. Beyne gönderilen 785 nm dalga boyundaki lazer beyin yüzeyinden 500  $\mu$ m içeri kadar ulaşabilmektedir. Tüm operasyon süresince 2 saniye aralıklar ile 20  $\mu$ m çözünürlüğünde görüntüler kaydedilmiştir. İskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks seviyelerinden beyin kan akımını ölçmek için bilgisayar programı vasıtasıyla 1 mm x 5.5 mm ölçüsündeki alanlar sırasıyla Bregma noktasından 0.5 mm posterior olmak üzere sırasıyla 0.5 mm, 1.5 mm ve 2.5 mm lateral merkez olmak üzere yerleştirilmiştir (Şekil 5.11.1.). Veriler operasyon öncesine göre yüzde değişim olarak hesaplandıktan sonra kontrol grubu olan %21 NBO + taşıyıcı grubuna oranlanarak hesaplanmıştır.

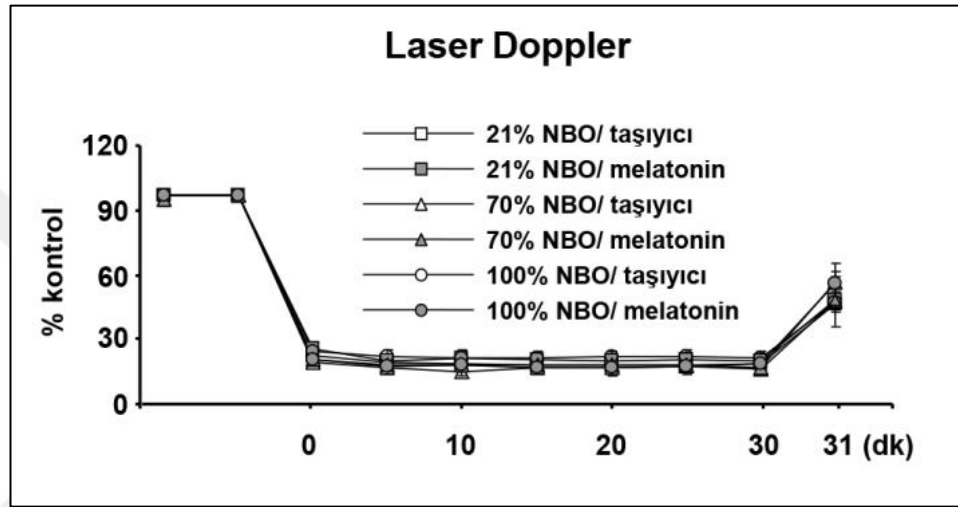
## 5.12. İstatistiksel Analizler

Deney grupları arasındaki istatistiksel analizler SPSS programı (Ibm) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü (*one-way*) varyans analizi (ANOVA) kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edilmiştir (*least significant difference*). Melatonin ve taşıyıcı grupları arasındaki istatistiksel analizler *independent samples t-testi* uygulanarak yapılmıştır.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Otuz Dakikalık OSA Tıkanması Laser Doppler Kaydı

30 dakikalık OSA tıkanması modelinin tekrar edilebilirliğini ve hayvan deneylerinin başarısının kontrolü için OSA'ın beslediği striatum bölgesinden (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) beyin felci operasyonları süresince LDF kaydı alınmıştır (Şekil 6.1.1.).

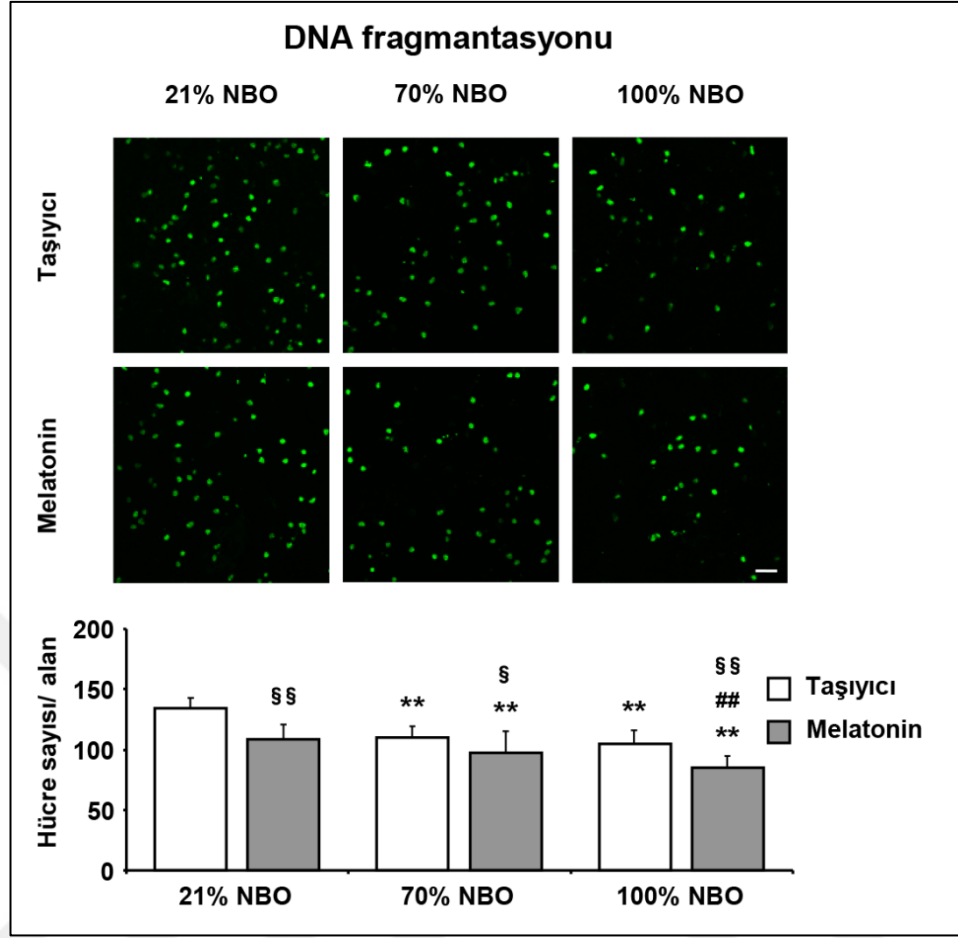


Şekil 6.1.1. 30 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir (n=7/ grup).

OSA'ın girişi ip tekniği kullanılarak tılandıktan sonra beyin kan akımı operasyon öncesine göre ortalama olarak %80 oranında düşmüştür. OSA'ın tıkalı kalığı 30 dakika boyunca beyin kan akımı operasyon öncesi sağlıklı beyin kan akımına oranla %20'lik oranda kalmıştır. İpin geri çekilmesi ile beraber beyin kan akımının tekrardan arttığı gösterildi. Reperfüzyon esnasında 1 dakika süresince LDF kaydı alınmıştır.

### 6.2. DNA Fragmantasyonu Analizi

30 dakika OSA tıkanması sonrası 72 saat reperfüzyon yapılan farelerden cryostat cihazı ile alınan 18  $\mu$ m kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine TUNEL boyaması yapılmıştır. Boyama işlemi gerçekleştirilen örneklerden konfokal mikroskop (LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Almanya) kullanılarak iskemik striatumda apoptotik hücre analizi yapılmıştır (Şekil 6.2.1.).



**Şekil 6.2.1.** TUNEL (+) hücre analizi. 30 dakika OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatumda apoptotik hücre analizi yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, ##p<0.01 %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §§p<0.01/ §p<0.05 melatonin tedavisi uygulanan NBO grubun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir (n=7/ grup).

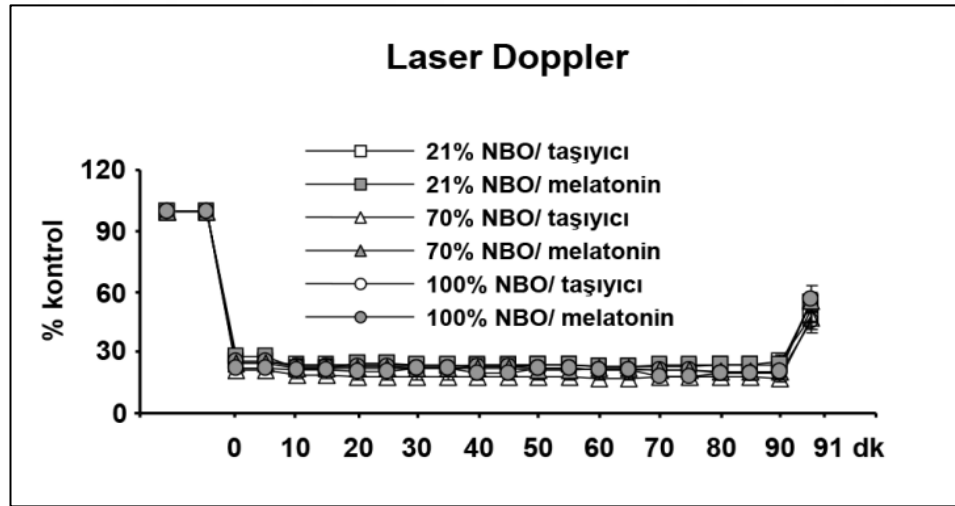
İskemik striatum seviyesinden her biri 62,500µm<sup>2</sup> olan 12 farklı alandan TUNEL (+) hücre sayılmıştır. Deney gruplarında sayılan ortalama apoptotik hücre sayıları; %21 NBO + taşıyıcı grubu 133.4 ± 9.7, %21 NBO + melatonin grubu 103.5 ± 17.5, %70 NBO + taşıyıcı grubu 110.1 ± 9.5, %70 NBO + melatonin grubu 97.3 ± 17.8, %100 NBO + taşıyıcı grubu 104.4 ± 11.4, %100 NBO + melatonin grubu 87.9 ± 12.1 olarak belirlenmiştir. Hem %70 NBO + taşıyıcı veya melatonin kombinasyonu hem de %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin kombinasyonu %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.01) bir şekilde apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca %21 NBO grubu kendi içerisinde kıyaslandığında melatonin uygulanan grubun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı



( $p<0.01$ ) bir şekilde apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. %70 NBO + taşıyıcı uygulanan tedavi grubu %100 NBO + melatonin uygulanan gruba göre kıyaslandığında TUNEL (+) hücre sayısının %100 NBO + melatonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.01$ ) derecede azaldığı bulunmuştur. %70 NBO + taşıyıcı uygulanan grubun %70 NBO + melatonin uygulanan göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir şekilde apoptotik hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir. %100 NBO + taşıyıcı uygulanan grup %100 NBO + melatonin uygulanan grup ile kıyaslandığında melatonin tedavisinin %100 NBO grubunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.01$ ) şekilde apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir.

### 6.3. Doksan Dakikalık OSA Tıkanması Laser Doppler Kaydı

90 dakikalık OSA tıkanması modelinin tekrar edilebilirliğini ve hayvan deneylerinin başarısının kontrolü için OSA'ın beslediği striatum bölgesinden (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) beyin felci operasyonları süresince LDF kaydı alınmıştır (Şekil 6.3.1.).



Şekil 6.3.1. 90 dakikalık OSA tıkanması modeli LDF kaydı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir (n=7/ grup).

OSA'ın girişi ip tekniği ile tılandıktan sonra beyin kan akımı operasyon öncesine göre ortalama olarak %80 oranında düşmüştür. OSA'ın tıkalı kaldığı 90 dakika boyunca beyin kan akımı operasyon öncesi sağlıklı beyin kan akımına oranla

%20'lik seviyede kalmıştır. İpin geri çekilmesi ile beraber beyin kan akımının tekrardan arttığı gösterilmiştir. İskemik bölgedeki bölgesel kanlanmanın reperfüzyonun başlangıcından itibaren 1 dk süresince arttığı LDF kayıtları vasıtasıyla gösterilmiştir.

#### 6.4. Nörolojik Hasar Skorlama

90 dakika OSA takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelere sakrifiye edilmeden hemen önce nörolojik durumlarına göre puanlama yapılmıştır (Şekil 6.4.1.). Uygulanan bu teste göre farelere 0 ile 4 arasında nörolojik durumlarına göre skorlar verilmiştir. Buna göre;

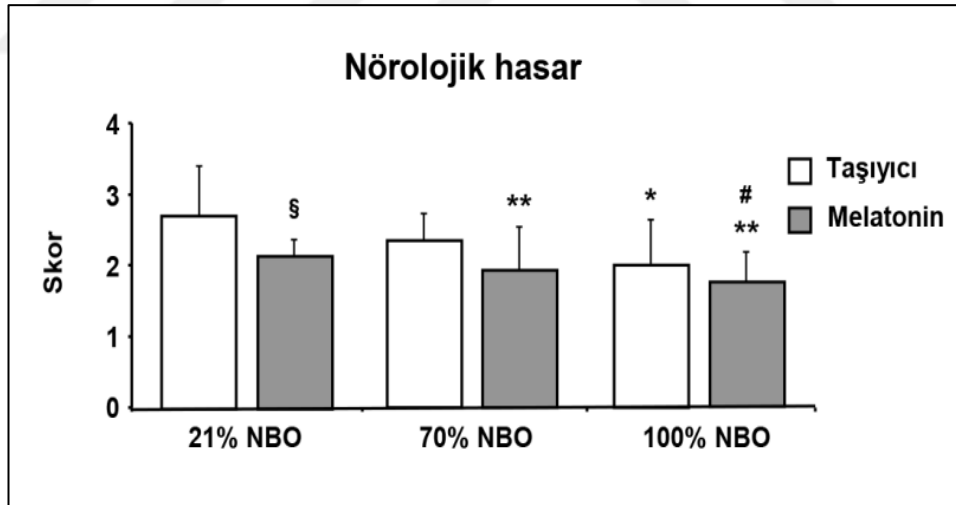
0=Normal fonksiyon,

1=Kuyruktan kaldırılınca kontralateral taraftaki eli çekme,

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

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

4=Herhangi bir motor aktivite olmadığı zaman.



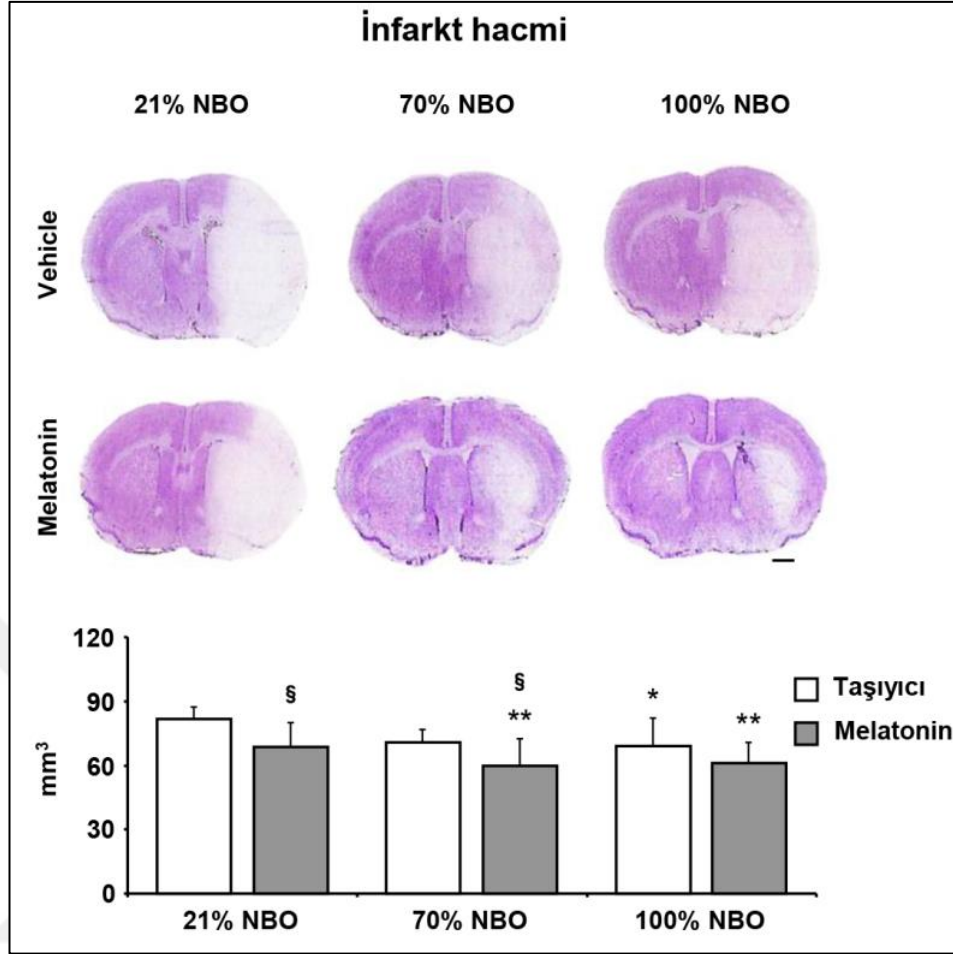
Şekil 6.4.1. Nörolojik skorlama. 90 dakika OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon sonunda uygulanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$ / $p < 0.05$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, # $p < 0.05$  %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, § $p < 0.05$  melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir (n=7/ grup).

Nörolojik skorlama yapılan farelerin ortalama skorları; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $2.7 \pm 0.7$ , %21 NBO + melatonin grubu  $2.1 \pm 0.2$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $2.4 \pm 0.4$ , %70 NBO + melatonin grubu  $1.9 \pm 0.6$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $2.0 \pm 0.4$

0.7, %100 NBO + melatonin grubu  $1.8 \pm 0.4$  olarak hesaplanmıştır. %21 NBO + taşıyıcı grubu %70 NBO + melatonin ( $p<0.01$ ), %100 NBO + melatonin ( $p<0.01$ ) ve %100 NBO + taşıyıcı ( $p<0.05$ ) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha iyi nörolojik davranışlara sahip oldukları gösterilmiştir. %70 NBO + taşıyıcı grubu %100 NBO grubuna, %21 NBO + taşıyıcı grubu da %21 NBO + melatonin grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak ( $p<0.05$ ) anlamlı ölçüde daha iyi nörolojik sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

### **6.5. İnfarkt Hacmi Analizi**

90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerin beyinleri cryostat yardımı ile 2 mm aralıklarla 18  $\mu$ m kalınlıkta kesildikten sonra infarkt hacmini ve beyin ödemi hesaplamak için cresyl violet boyaması yapılmıştır. Boyama yapılan kesitlerden bilgisayar programı (Image J) yardımıyla hasarlı alanlar ve toplam beyin alanları ölçülerek infarkt hacmi ve ödem hesaplanmıştır (Şekil 6.5.1).

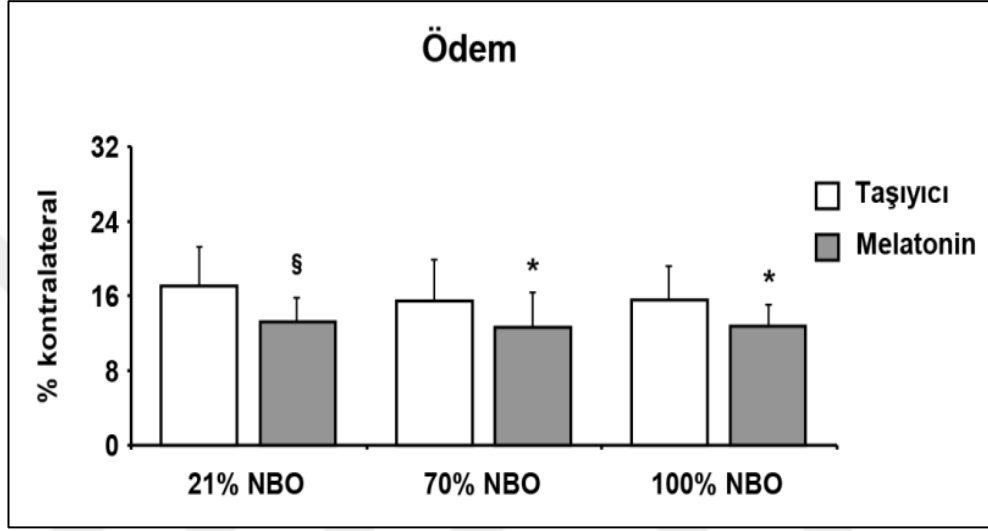


**Şekil 6.5.1.** Cresyl violet boyaması ile infarkt hacmi ölçümü. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$ / \* $p < 0.05$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, § $p < 0.05$  melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir (n=7/ grup).

Hasar alanları sırasıyla %21 NBO + taşıyıcı grubu  $81.6 \pm 5.8 \text{ mm}^2$ , %21 NBO + melatonin grubu  $68.6 \pm 11.5 \text{ mm}^2$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $70.8 \pm 6.2 \text{ mm}^2$ , %70 NBO + melatonin grubu  $59.6 \pm 13.2 \text{ mm}^2$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $68.9 \pm 13.2 \text{ mm}^2$ , %100 NBO + melatonin grubu  $61.2 \pm 9.7 \text{ mm}^2$  olarak hesaplanmıştır. %70 NBO + melatonin ve %100 NBO + melatonin grupları %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) anlamlı ölçüde hasar hacmini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca %100 NBO + taşıyıcı grubu da %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak ( $p < 0.05$ ) anlamlı ölçüde hasar hacmini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu bilgilere ek olarak, taşıyıcı verilmiş %21 NBO ve %70 NBO grupları melatonin ile kombine edildiğinde istatistiksel olarak ( $p < 0.05$ ) anlamlı bir şekilde hasar hacmini düşürdükleri gözlemlenmiştir.

## 6.6. Ödem Analizi

90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerden alınan beyin kesitlerine cresyl violet boyaması yapıldıktan sonra beyin ödemi iskemik hemisferin kontralateral hemisfere göre farkı hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 6.6.1.).

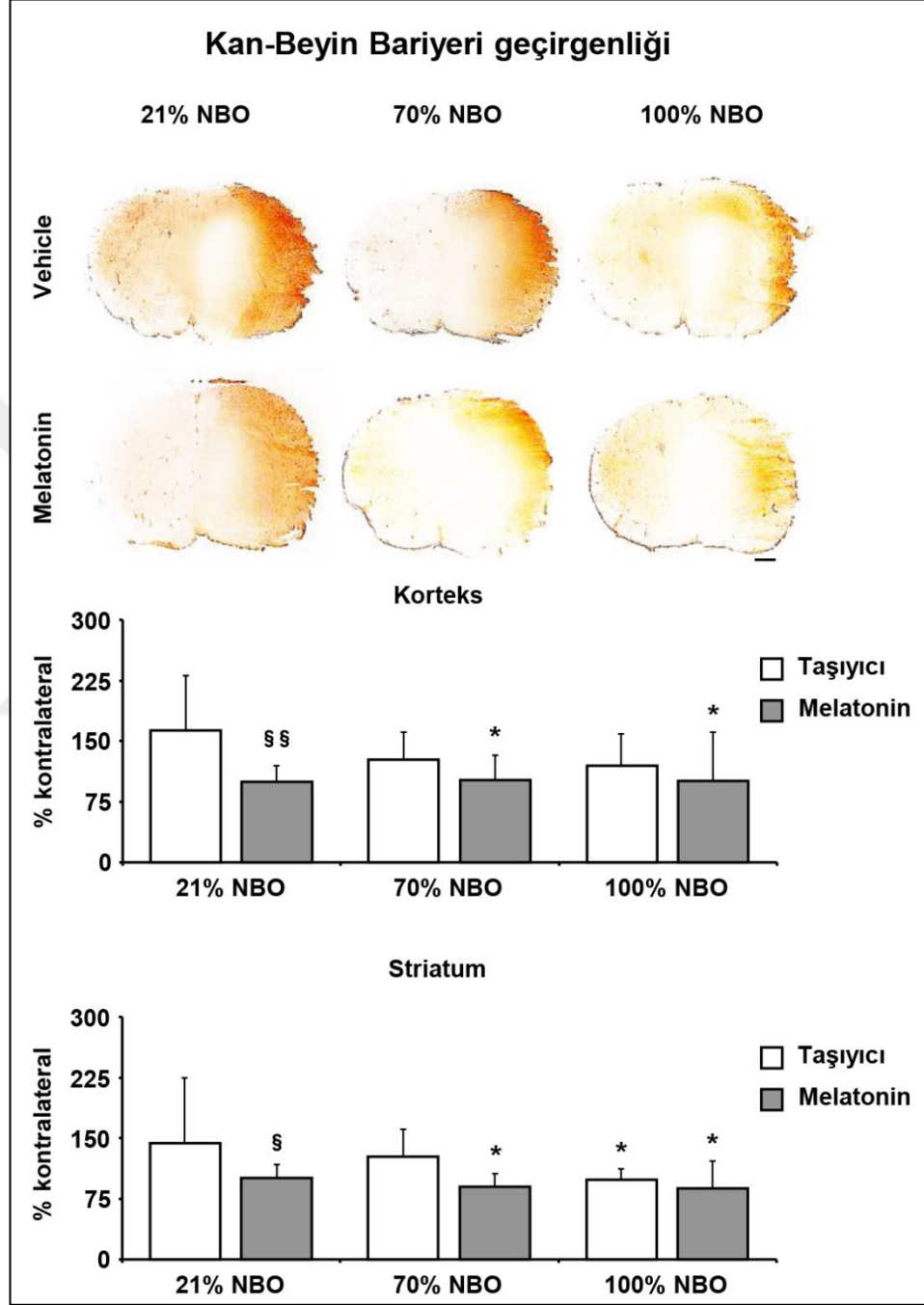


**Şekil 6.6.1.** Cresyl violet boyaması ile sitotoksik ödem hesaplanması. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, § $p < 0.05$  melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir (n=7/ grup).

90 dakika OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon sonrasında oluşan sitotoksik ödemler sırasıyla %21 NBO + taşıyıcı grubu  $17.1 \pm 4.2$ , %21 NBO + melatonin grubu  $13.2 \pm 2.6$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $15.5 \pm 4.4$ , %70 NBO + melatonin grubu  $12.6 \pm 3.7$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $15.5 \pm 3.6$ , %100 NBO + melatonin grubu  $12.6 \pm 2.1$  olarak hesaplanmıştır. %70 NBO + melatonin grubu ve %100 NBO + melatonin grubu %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak ( $p < 0.05$ ) anlamlı şekilde daha az ödeme sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak %21 NBO + melatonin grubu %21 NBO + taşıyıcı grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak ( $p < 0.05$ ) anlamlı bir şekilde daha az ödeme sahip olduğu gösterilmiştir.

## 6.7. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği

90 dakika OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon uygulanan farelerdeki KBB geçirgenliğini hesaplamak için IgG boyaması yapılmıştır (Şekil.6.7.1.).



**Şekil 6.7.1.** Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin iskemik korteks ve striatum seviyesinde değerlendirilmesi. KBB geçirgenliği striatum seviyesinden 2 mm aralıklarla alınmış olan beyin kesitlerine IgG boyaması yapılarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama± standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §§ $p < 0.01$ / $§p < 0.05$  melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir (n=7/ grup).

IgG boyaması sonrası KBB geçirgenliği iskemik alandaki bozulmanın kontralateral hemisfere oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Beyin felci sonrası KBB geçirgenliği korteks ve striatum seviyelerinden hesaplanmıştır.

KBB geçirgenliğinin ipsilateral korteksin kontralateral kortekse oranları; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $163.1 \pm 67.8$ , %21 NBO + melatonin grubu  $99.1 \pm 19.8$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $126.8 \pm 34.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $102.3 \pm 29.8$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $119.4 \pm 39.9$ , %100 NBO + melatonin grubu  $100.8 \pm 60.1$  olarak hesaplanmıştır. %70 NBO + melatonin ve %100 NBO + melatonin grupları %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir şekilde KBB geçirgenliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ek olarak %21 NBO + melatonin grubu %21 NBO + taşıyıcı grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.01$ ) olarak KBB geçirgenliğinde daha az bir bozulmanın olduğu gösterilmiştir.

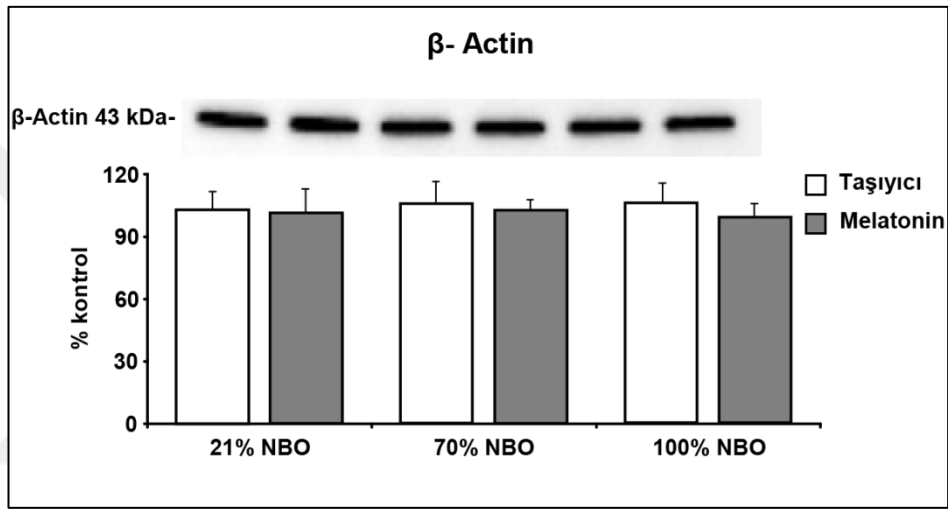
İpsilateral striatum seviyesinde yapılan ölçümlerin kontralateral striatuma oranları; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $143.7 \pm 60.9$ , %21 NBO + melatonin grubu  $100.4 \pm 16.4$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $126.8 \pm 34.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $89.4 \pm 16.5$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $98.7 \pm 13.5$ , %100 NBO + melatonin grubu  $87.5 \pm 34.6$  olarak hesaplanmıştır. %70 NBO + melatonin, %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin grupları %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir şekilde KBB geçirgenliğinin striatum seviyesinde azalttığı gözlemlenmiştir. Ek olarak %21 NBO + melatonin grubu %21 NBO + taşıyıcı grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olarak KBB geçirgenliğinde daha az bir bozulmanın olduğu gösterilmiştir.

## 6.8. Western Blot Sonuçları

90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon yapılan farelerin ipsilateral striatum seviyesinden alınan doku rneklarına Western Blot tekniği kullanılarak protein analizleri yapılmıştır. Yapılan protein ölçümlerinden fosforlanmış Akt toplam Akt proteinine, Bax, Bcl-xL, nöronal NOS (nNOS), eNOS ve iNOS proteinleri ise  $\beta$ -Aktin proteinine göre normalize edilerek hesaplanmıştır.

### 6.8.1. $\beta$ -aktin protein analizi

Western Blot tekniği ile protein analizi için %21 NBO + taşıyıcı, %21 NBO + melatonin, %70 NBO + taşıyıcı, %70 NBO + melatonin, %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarından 20  $\mu$ g protein yüklendikten sonra jel elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Her grup için eşit miktarda protein yüklemesinin yapıldığı  $\beta$ -Aktin protein seviyesi analizi ile gösterilmiştir (Şekil 6.8.1.1.).



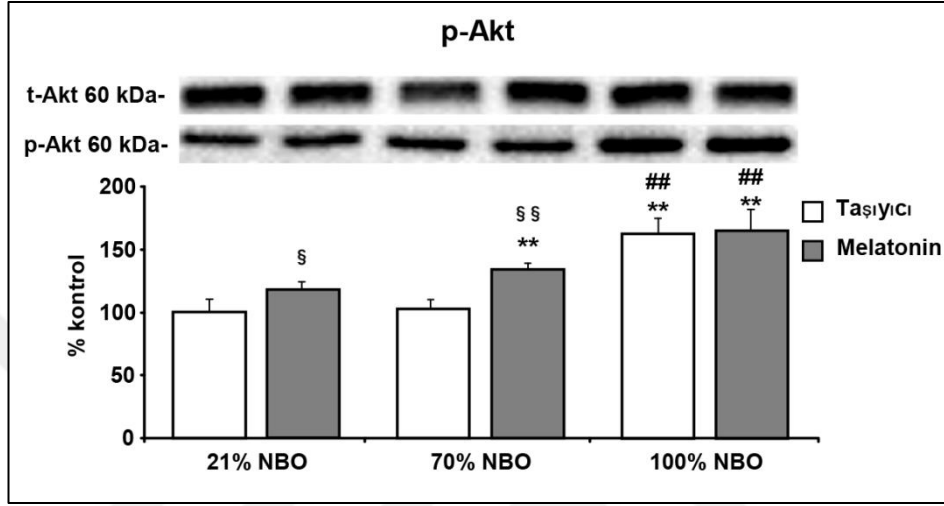
**Şekil 6.8.1.1.**  $\beta$ -Aktin protein seviyesi. 90 dakika orta serebral arter tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda  $\beta$ -Aktin protein seviyesi analiz edilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Western Blot sonrasında  $\beta$ -aktin protein ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 7.5$ , %21 NBO + melatonin grubu  $99.2 \pm 9.4$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $103.8 \pm 4.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $98.6 \pm 2.2$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $104.0 \pm 9.0$ , %100 NBO + melatonin grubu  $97.9 \pm 3.6$  olarak hesaplanmıştır.



## 6.8.2. Fosforlanmış Akt protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon yapılan farelerin iskemik striatum seviyesinden alınan dokularla yapılan Western Blot tekniği ile fosforlanmış Akt protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.2.1.).

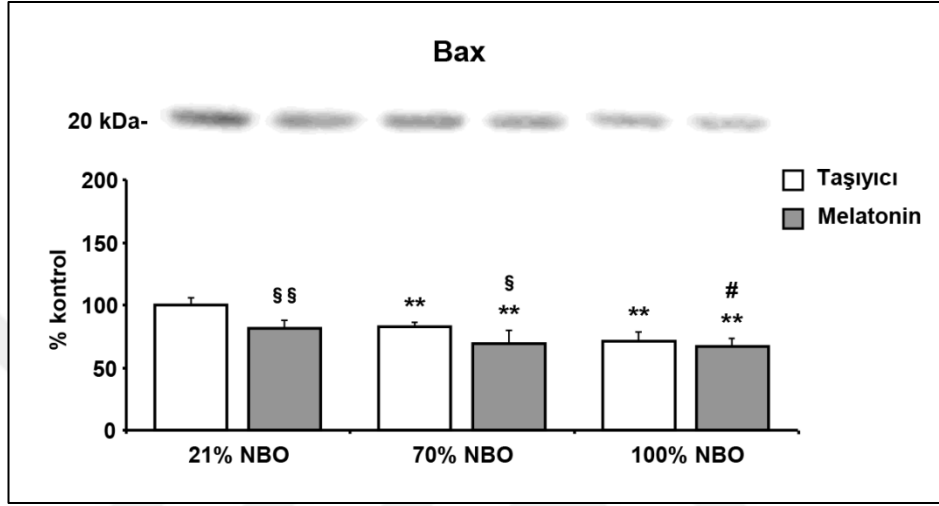


**Şekil 6.8.2.1.** Fosforlanmış Akt protein seviyesi. 90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda p-Akt protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, ## $p < 0.01$  %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §§ $p < 0.01$  / § $p < 0.05$  melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Fosforlanmış Akt proteini için ölçümler %21 NBO + taşıyıcı grubuna oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 18.5$ , %21 NBO + melatonin grubu  $126.2 \pm 9.3$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $119.3 \pm 12.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $159.0 \pm 5.7$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $171.70 \pm 14.0$ , %100 NBO + melatonin grubu  $181.2 \pm 16.9$  olarak hesaplanmıştır. Akt protein seviyesi %70 NBO + melatonin, %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarında %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.01$ ) bir şekilde artmıştır. %70 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarında Akt fosforilasyonu istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.01$ ) derecede artmıştır. Ek olarak Akt fosforilasyonu %21 NBO + melatonin grubunda %21 NBO taşıyıcı grubuna göre ( $p < 0.05$ ) ve %70 NBO + melatonin grubunda %70 NBO + taşıyıcı grubuna göre ( $p < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır.

### 6.8.3. Bax protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin ipsilateral striatum seviyesinden alınan dokularla yapılan Western Blot tekniği ile Bax protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.3.1.).

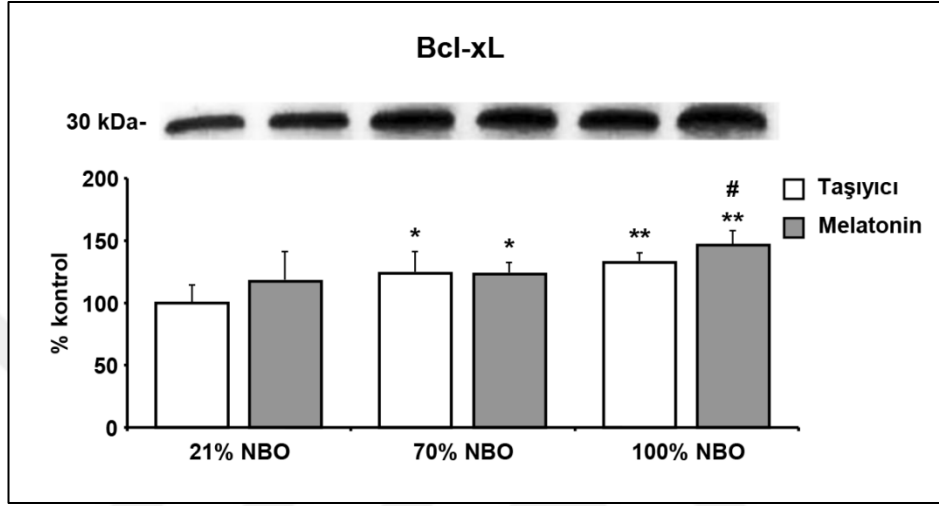


**Şekil 6.8.3.1.** Bax protein seviyesi. 90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda apoptoza yol açan Bax protein seviyesinin analizi yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, #p<0.05 %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §§p<0.01/§p<0.05 melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Western Blot sonrasında Bax protein seviyesinin ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak verilmiştir. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 5.7$ , %21 NBO + melatonin grubu  $81.6 \pm 6.1$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $86.6 \pm 1.6$ , %70 NBO + melatonin grubu  $69.3 \pm 10.3$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $71.5 \pm 6.8$ , %100 NBO + melatonin grubu  $66.8 \pm 6.8$  olarak hesaplanmıştır. Apoptoza yol açtığı bilinen Bax protein seviyesi hem %70 NBO hem de %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin enjeksiyonu yapılmış gruplarda istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.01$ ) derecede azaldığı gözlemlenmiştir. %100 NBO + melatonin grubunda %70 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla Bax protein seviyesinin azaldığı görülmüştür. Ek olarak melatonin tedavisine bağlı olarak %21 NBO + melatonin grubunda %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre ( $p < 0.01$ ) ve %70 NBO + melatonin grubunda %70 NBO + taşıyıcı grubuna göre ( $p < 0.05$ ) Bax protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

#### 6.8.4. Bcl-xL protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon yapılan farelerden alınan dokulardan yapılan Western Blot tekniği ile Bax protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.4.1.).

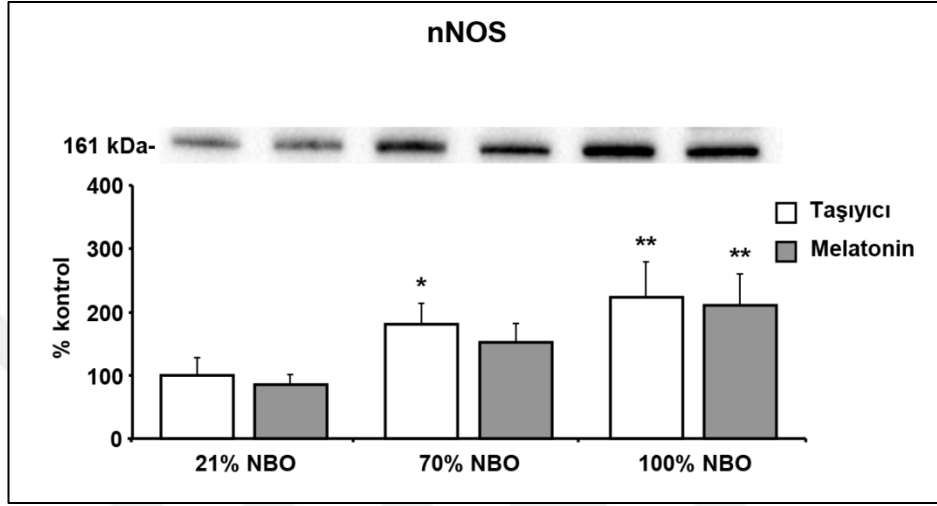


**Şekil 6.8.4.1.** Bcl-xL protein seviyesi. 90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda apoptozu engelleyen Bcl-xL protein seviyesi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$  / \* $p < 0.05$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, # $p < 0.05$  %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Protein ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak verilmiştir. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 14.2$ , %21 NBO + melatonin grubu  $117.2 \pm 7.6$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $123.9 \pm 15.8$ , %70 NBO + melatonin grubu  $123.3 \pm 7.9$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $132.7 \pm 6.2$ , %100 NBO + melatonin grubu  $146.5 \pm 5.6$  olarak hesaplandı. Apoptoz sinyal yolağını engelleyen bir protein olan Bcl-xL seviyesi %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında %70 NBO + taşıyıcı, %70 NBO + melatonin gruplarında  $p < 0.05$ , %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarında  $p < 0.01$  olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak %100 NBO + melatonin grubunda %70 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla Bcl-xL protein seviyesinin anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) arttığı gözlemlenmiştir.

### 6.8.5. nNOS protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon yapılan farelerden alınan dokularla yapılan Western Blot tekniği ile nNOS protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.5.1.).

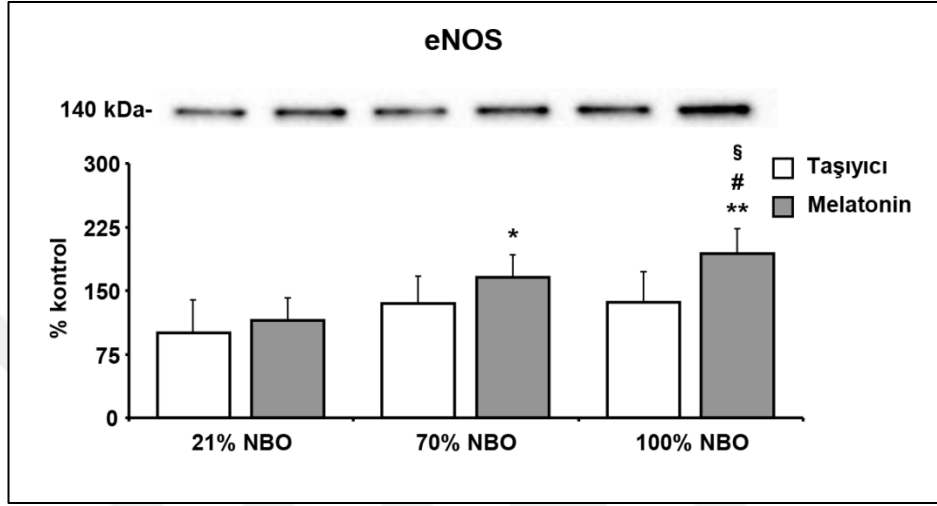


**Şekil 6.8.5.1.** nNOS protein seviyesi. 90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda nNOS protein seviyesinin analizi yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01/ \*p<0.05 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Protein ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 28.5$ , %21 NBO + melatonin grubu  $84.9 \pm 16.1$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $180.8 \pm 32.7$ , %70 NBO + melatonin grubu  $151.9 \pm 30.6$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $224.2 \pm 55.3$ , %100 NBO + melatonin grubu  $211.0 \pm 49.9$  olarak hesaplandı. Artan  $O_2$  konsantrasyonlarına bağlı olarak bir nNOS artışı olduğu ve melatonin tedavisinin bu artışı azalttığı gözlemlenmiştir. nNOS protein seviyesi %70 NBO + taşıyıcı grubunda ( $p < 0.05$ ), %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarında ( $p < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış olduğu gözlemlenmiştir.

### 6.8.6.1. eNOS protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon uygulanan farelerin iskemik striatum seviyesinden alınan dokulardan yapılan Western Blot tekniği ile Bax protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.6.1.).

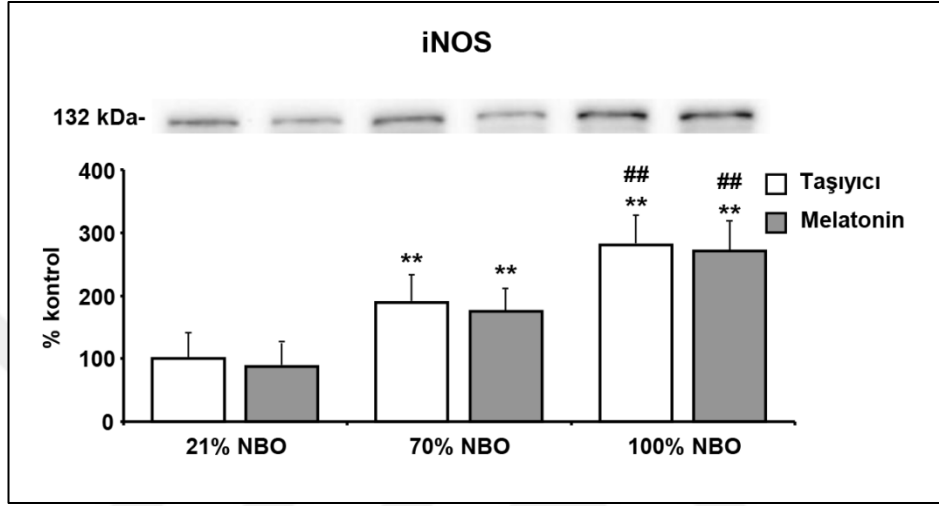


**Şekil 6.8.6.1.** eNOS protein seviyesi. 90 dakika OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda eNOS protein analizi yapılmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01/ \*p<0.05 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, #p<0.05 %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §p<0.05 melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Protein ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 38.8$ , %21 NBO + melatonin grubu  $115.4 \pm 25.6$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $134.8 \pm 32.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $166.3 \pm 26.6$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $136.4 \pm 36.2$ , %100 NBO + melatonin grubu  $193.6 \pm 30.1$  olarak hesaplandı. O<sub>2</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak eNOS seviyesinde bir artış olduğu ve melatonin kombinasyonları NBO tedavilerindeki eNOS seviyelerini arttırdığı gözlemlenmiştir Buna göre %70 NBO + melatonin (p<0.05) ve %100 NBO + melatonin (p<0.01) grupları %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde eNOS protein seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca %100 NBO + melatonin grubunda eNOS protein seviyesi %70 NBO + taşıyıcı veya %100 NBO + taşıyıcı gruplarına kıyaslandığında istatistiksel olarak (p<0.05) anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

### 6.8.7. iNOS protein analizi

90 dakikalık OSA tıkanması sonrası 24 saat reperfüzyon yapılan farelerden alınan dokularla yapılan Western Blot tekniği ile Bax protein seviyesi hesaplanmıştır (Şekil 6.8.7.1.).

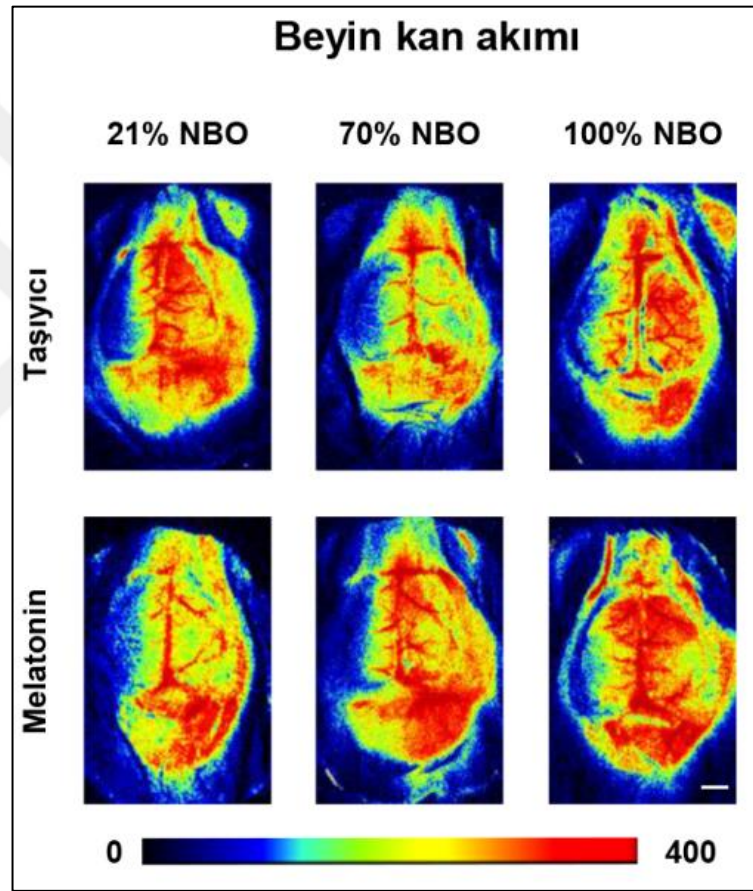


**Şekil 6.8.7.1.** Bax protein seviyesi. 90 dakika orta serebral arter tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon sonunda iNOS protein seviyesi hesaplanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, ## $p < 0.01$  %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Protein ölçümleri üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Protein ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 27.9$ , %21 NBO + melatonin grubu  $88.0 \pm 24.2$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $188.8 \pm 28.0$ , %70 NBO + melatonin grubu  $174.7 \pm 24.8$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $280.9 \pm 32.2$ , %100 NBO + melatonin grubu  $271.2 \pm 36.5$  olarak hesaplandı. %21 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla hem %70 NBO + taşıyıcı veya melatonin hem de %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin ile muamele edilmiş gruplarda istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) iNOS protein anlatımının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin grupları da %70 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) artmış bir iNOS protein seviyesi gözlemlenmiştir.

## 6.9. Lazer Speckle Görüntüleme Tekniği ile Beyin Kan Akımı Takibi

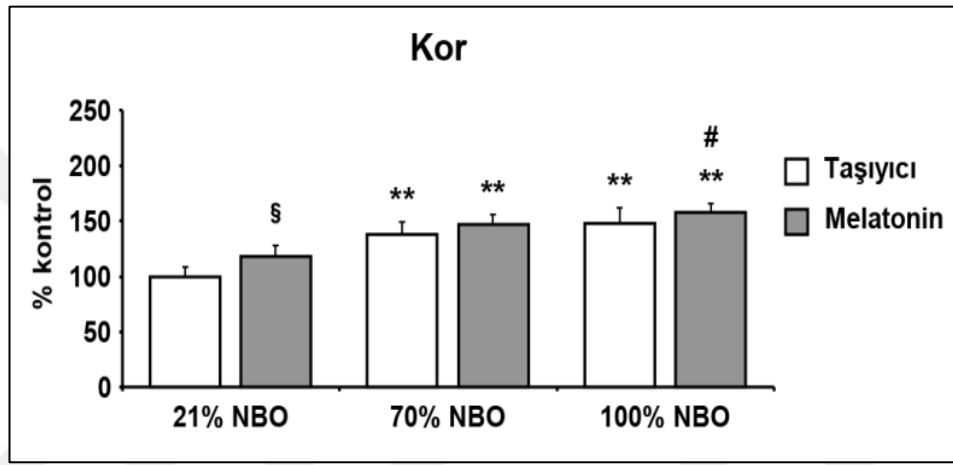
90 dakika OSA tıkanması sonrası akut olarak 90 dakikalık NBO tedavisi süresince beyin kan akımı gerçek zamanlı olarak Lazer Speckle görüntüleme (LSI) tekniği kullanılarak gözlemlenmiştir (Şekil 6.9.1.). 90 dakika sonunda iskemik kor (Şekil 6.9.1.1.), penumbra (Şekil 6.9.2.1.) ve hasarsız korteks (Şekil 6.9.3.1.) seviyesindeki toplam kan akımını bilgisayar programı (PIMSoft; Perimed) vasıtasıyla yerleştirilen 1 mm x 5.5 mm ölçüsündeki alanlarla hesaplanmıştır.



**Şekil 6.9.1.** LSI tekniği ile beyin kan akımı analizi. 90 dakika OSA tıkanması sonrası reperfüzyonun hemen başlangıcında uygulanan %21, %70 veya %100 NBO tedavisinin taşıyıcı veya melatonin ile kombinasyonunun beyin kan akımına olan etkilerinin LSI tekniği ile analiz edilmiştir. Siyah renkten kırmızıya doğru verilen renklendirme bölgesel kanlanmayı göstermektedir. Kırmızı ile ifade edilen bölgelerde beyin kan akımının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

### 6.9.1. İskemik kor bölgesindeki kan akımı

90 dakika OSA tıkanması sonrası reperfüzyonun hemen başlangıcında 90 dakika süresince uygulanan %21, %70 veya %100 NBO tedavilerinin taşıyıcı veya melatonin ile kombinasyonlarının iskemik kor bölgesindeki beyin kan akımına etkileri hesaplanmıştır (Şekil 6.9.1.1.). Bilgisayar programı (PIMSoft; Perimed) vasıtasıyla Bregma noktasına göre 0.5 mm lateral ve 0.5 mm posterior merkez olmak üzere belirlenen 1 mm x 5.5 mm ölçüsündeki alanda serebral mikrodolaşım hesaplanmıştır (122, 123).



**Şekil 6.9.1.** İskemik kor bölgesindeki toplam kan akımı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, #p<0.05 %70 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı, §p<0.05 melatonin uygulanan NBO grubunun taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir (n=4/grup).

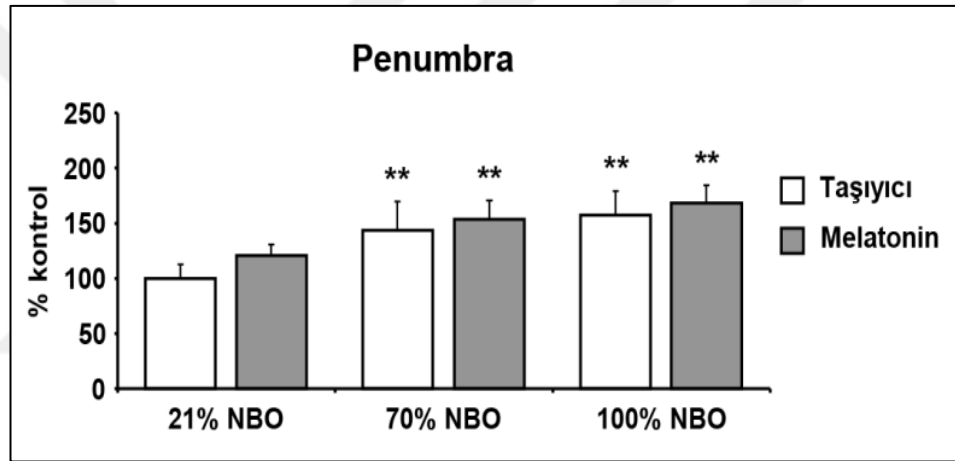
Beyin kan akımı ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna yüzdelik değişim olarak verilmiştir. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 8.8$ , %21 NBO + melatonin grubu  $118.2 \pm 9.8$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $137.9 \pm 11.1$ , %70 NBO + melatonin grubu  $147.0 \pm 9.2$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $147.5 \pm 14.6$  %100 NBO + melatonin grubu  $157.9 \pm 10.5$  olarak hesaplanmıştır. %21 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla hem %70 NBO + taşıyıcı veya melatonin hem de %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin ile muamele edilmiş gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede ( $p<0.01$ ) beyin kan akımının iskemik kor bölgesinde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca %100 NBO + melatonin grubunda %70 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede ( $p<0.05$ ) arttığı gösterilmiştir. Ek olarak %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında %21 NBO + melatonin grubunda beyin kan akımının



istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak beyin mikrodolaşımının arttığı gösterilmiştir.

### 6.9.2. Penumbra bölgesindeki kan akımı

90 dakika OSA tıkanması sonrası reperfüzyonun hemen başlangıcında 90 dakika süresince uygulanan %21, %70 veya %100 NBO tedavilerinin taşıyıcı veya melatonin ile kombinasyonlarının penumbra bölgesindeki beyin kan akımına etkileri hesaplanmıştır (Şekil 6.9.2.1.). Bilgisayar programı (PIMSoft; Perimed) vasıtasıyla Bregma noktasına göre 1.5 mm lateral ve 0.5 mm posterior merkez olmak üzere belirlenen 1 mm x 5.5 mm ölçüsündeki alanda beyin kan akımı ölçülmüştür (122, 123).

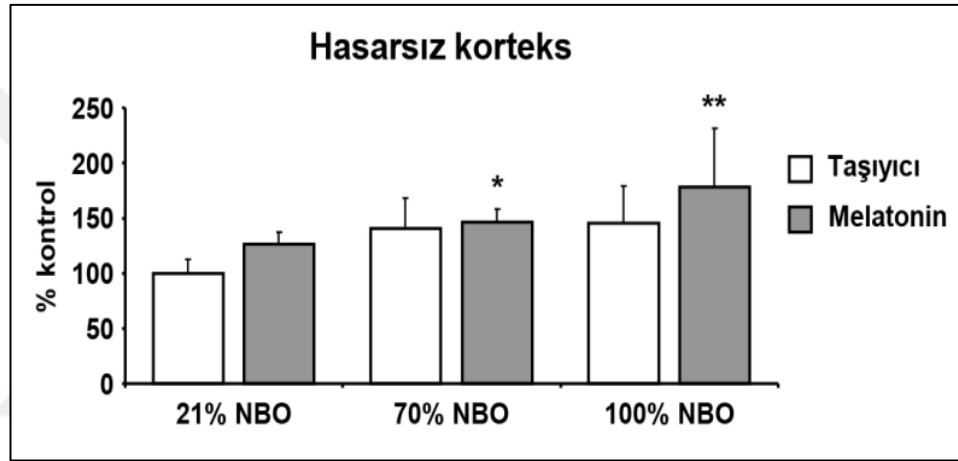


**Şekil 6.9.2.1.** İskemik penumbra bölgesindeki toplam kan akımı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $**p<0.01$  %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir (n=4/ grup).

Beyin kan akımı ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna yüzdelerle değişim olarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 13.1$ , %21 NBO + melatonin grubu  $121.3 \pm 9.6$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $143.7 \pm 25.9$ , %70 NBO + melatonin grubu  $153.5 \pm 17.8$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $157.0 \pm 22.4$  %100 NBO + melatonin grubu  $168.3 \pm 16.0$  olarak hesaplanmıştır. %21 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla hem %70 NBO + taşıyıcı veya melatonin hem de %100 NBO + taşıyıcı veya melatonin ile muamele edilmiş gruplarda istatistiksel olarak ( $p<0.01$ ) beyin kan akımının iskemik penumbra bölgesinde arttığı gösterilmiştir.

### 6.9.3. Hasarsız korteks bölgesindeki kan akımı

90 dakika OSA tıkanması sonrası reperfüzyonun hemen başlangıcında 90 dakika süresince uygulanan %21, %70 veya %100 NBO tedavilerinin taşıyıcı veya melatonin ile kombinasyonlarının beyin felci sonrası hasardan etkilenmeyen hasarsız korteks bölgesindeki beyin kan akımına etkileri gösterilmiştir (Şekil 6.9.3.1.). Bilgisayar programı (PIMSoft; Perimed) vasıtasıyla Bregma noktasına göre 2.5 mm lateral ve 0.5 mm posterior merkez olmak üzere belirlenen 1 mm x 5.5 mm ölçüsündeki alanda beyin kan akımı hesaplanmıştır (122, 123).



Şekil 6.9.3.1. İskemik hemisferde hasardan etkilenmeyen korteks alanındaki toplam kan akımı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p<0.01/ \*p<0.05 %21 NBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir (n=7/ grup).

Beyin kan akımı ölçümleri %21 NBO + taşıyıcı grubuna yüzdelik değişim olarak hesaplanmıştır. Buna göre; %21 NBO + taşıyıcı grubu  $100.0 \pm 12.8$ , %21 NBO + melatonin grubu  $126.2 \pm 11.1$ , %70 NBO + taşıyıcı grubu  $141.0 \pm 26.9$ , %70 NBO + melatonin grubu  $146.3 \pm 11.8$ , %100 NBO + taşıyıcı grubu  $145.4 \pm 33.4$  %100 NBO + melatonin grubu  $177.7 \pm 53.8$  olarak hesaplanmıştır. %21 NBO + taşıyıcı grubuna kıyasla hem %70 NBO + melatonin ( $p<0.05$ ) hem de %100 NBO + melatonin ( $p<0.01$ ) ile kombinasyonu gruplarında istatistiksel olarak beyin kan akımının hasarsız korteks bölgesinde arttığı gösterilmiştir.

## 7. TARTIŞMA

Beyin felci dünyada ölüm nedenleri bakımından incelendiğinde 3. sırada yer alan önemli bir hastalıktır. Her üç beyin felci vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken hayatta kalan hastalar ise yaşamlarının geri kalan kısımlarında önemli fonksiyonel bozukluklar ile sürdürmek zorunda kalmaktadırlar. Beyin felcinin günümüzde bilinen tek tedavisi ilk 6 saat içerisinde uygulanması gereken tPA tedavisidir. Önemli sonuçları olan ve kısıtlı bir tedavisi olan beyin felci en fazla kalıcı fonksiyonel bozuklukla sonuçlanan bir hastalık olmasına rağmen binlerce deneysel çalışmanın yanı sıra 60'ın üzerinde de klinik çalışma başarısızlık ile sonuçlanmıştır. Başarısızlıkla sonuçlanan klinik çalışmalar dikkate alındığında (i) deneysel çalışmalarda etki mekanizmalarının ayrıntılı çalışılmaması sonucunda yan etkilerinin klinik çalışmalarda açığa çıkması ve (ii) nöroprotektif olan moleküllerin aynı zamanda restoratif etkilerinin olmaması nedenleri ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışmada NBO tedavisinin melatonin ile kombinasyonunun postakut iskemik beyinde hücre ölüm mekanizmaları, nörolojik iyileşme ve beyin mikrodolaşımı üzerine etkileri literatürde ilk defa gösterilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen proteinler ve etki ettikleri sinyal yollarıyla beyin felci sonrası yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir. Ayrıca bu tez kapsamında elde edilen bulguların özellikle travma ve omurilik hasarı gibi benzer patofizyolojiye sahip süreçlerde de rol oynayan faktörlerin tespit edilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Buna ilaveten elde edeceğimiz bulguların beyin felci sonrası tedavi amaçlı yeni hedef moleküllerin belirlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Beyne giden damarların tıkanması veya hasarlanması sonucunda beyne yeterli miktarda kan gidememektedir. Kan akışının engellenmesi beyin dokusunda oksijen ve enerji eksikliğine neden olarak kompleks patofizyolojik süreçlerin tetiklenmesine neden olmaktadır. Özellikle reperfüzyon başlangıcında beyin dokusundaki oksijenlenmenin artırılması yeni ve alternatif tedavi yöntemleri arasında değerlendirilmektedir. Bölgesel oksijenlenmeyi arttırmak için uygulanacak olan oksijen tedavileri uygulanan atmosfer basınç oranına ve uygulanacak olan oksijen

miktarına bağılı olarak çeşitlilik göstermektedir. Oksijen tedavileri uygulanan basınç seviyelerine göre değerlendirildiğinde basınç seviyesinin atmosfer koşulları altında olduğu tedavilere NBO, basınç seviyesinin atmosfer basıncından yüksek bir seviyede tutulduğu oksijen tedavilerine ise HBO tedavisi denilmektedir.

Literatürde beyin felci sonrası uygulanan oksijen tedavilerinin farklı sonuçlar göstermesi bu konunun tekrardan değerlendirilmesi gerçeğini ortaya çıkarmaktadır. Özellikle HBO tedavisinin uygulamasının pahalı olması, bulunabilirliği ve uygulanabilirliğinin düşük olmasının yanı sıra sahip olduğu yan etkilerden dolayı (Basınca bağılı travma (barotravma), kardiyak atımı düşürür, kan pH'sı asidik tarafa kayar, miyopi'ye sebep olabilir) çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir (124-127). Erişilebilirliği ve uygulanması daha kolay ve ucuz bir yöntem olan NBO tedavisi aynı zamanda HBO tedavisine kıyasla daha az yan etkilere sahiptir. Bu sebeplerden dolayı özellikle iskemi gibi patofizyolojik süreçlerde akut olarak NBO uygulanması ön plana çıkmaktadır (128, 129).

Beyin felci sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri iskemik hasarın artmasına neden olmaktadır (130, 131). Bunun yanında beyin felci sonrasında uygulanacak olan NBO tedavisinin de oksijen serbest radikallerini arttıracığı düşünüldüğünde NBO tedavisinin serbest radikal yakalayıcı bir molekül ile kombinasyonunun tedavinin etkinliğini arttıracığı düşünülmektedir. Bu bağlamda serbest radikal yakalayıcı bir molekül olan melatonin ile NBO tedavisini kombine ederek tedavinin etkinliğini arttırmak hedeflenmiştir. Bu tez kapsamında uygulanacak olan NBO tedavileri farelerde OSA tıkanması sonrası etkinliği daha önce gösterilmiş olan 4 mg/kg dozunda melatonin tedavisi ile kombine edilmiştir (85, 86, 110).

Beyin felci vakalarının %80'i gibi büyük bir çoğunluğu OSA'in tıkanması ile meydana gelirken %20'lik bir kısmı ile beyni besleyen damarların hemorajı sonrasında ortaya çıkmaktadır. Beyin felcine yönelik deney hayvanları çalışmalarında klinikte en fazla görülen OSA tıkanması üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu tez kapsamında deneysel beyin felci metodu olarak OSA tıkanması metodu kullanılmıştır.

Yapılan bu tez kapsamında deney grupları oluşturulurken normal atmosfer koşullarına (%21 O<sub>2</sub>) ek olarak %70 ve %100 oksijen tedavilerinin iskemi sonrası

etkinliğini görmek için üç farklı grup oluşturulmuştur. Hem beyin felci sonrası artan hem de NBO tedavileri sonrasında daha da artması beklenen oksijen serbest radikallerinin etkisini en aza indirmek için NBO tedavileri 4 mg/kg dozunda melatonin ile kombine edilmiştir. NBO tedavisi ve melatonin ile kombinasyonunun beyin felci sonrası etkilerini görmek amacıyla iki farklı OSA tıkanması metodu ve üç farklı deney seti yapılmıştır. Nöronal hasar ve apoptotik hücre ölümü analizi için 30 dakikalık OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon modeli uygulanmıştır. Enfarktüs hacmi, sitotoksik ödem, KBB geçirgenliği, nörolojik skorlama ve hücre içi sinyal yolları analizi için 90 dakikalık OSA tıkanması takiben 24 saat reperfüzyon modeli kullanılmıştır. Son olarak tedavilerin beyin kan akımı üzerine etkilerinin LSI ile analizi için 90 dakikalık OSA tıkanması modeli gerçekleştirilmiştir. Melatonin veya kontrol enjeksiyonları da reperfüzyonun hemen başlangıcında periton içi enjeksiyon ile uygulanmıştır. Ayrıca NBO tedavileri (%21, %70 veya %100) iskemi sonrası reperfüzyonun hemen başlangıcında özel olarak hazırlanmış olan oksijen kabinlerinde uygulanmıştır.

Deneysel beyin felci metodu OSA'in girişinin ip tekniği kullanılarak kapatılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu sayede farelerde OSA'in beslediği striatum seviyesindeki beyin kan akımı kesilmiştir (132, 133). Beyin felci operasyonlarının güvenilirliğini ve tekrar edilebilirliğinin kontrolü için OSA'in beslediği striatum seviyesinden LDF cihazı ile beyin kan akımı takibi yapılmıştır. Filament tekniği ile OSA' in girişinin tıkanması ile beyin kan akımı operasyon öncesine göre yaklaşık olarak %80 oranında düşüş göstermiştir. Beyin kan akımının normal koşullara göre %80 azalması deneysel beyin felcinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (134). Ayrıca filamentin geri çekilmesiyle beyin kan akımının tekrardan arttığı gösterilmiştir. Elde edilen LDF kayıtları 30 veya 90 dakikalık deneysel beyin felci metodlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 6.1.1. ve Şekil 6.3.1.)

30 dakikalık OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon modeli nöronal hasar mekanizmalarının analizleri için kullanılan bir tekniktir (133, 135). Bu teknik kullanılarak NBO tedavisi ve melatonin kombinasyonunun apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri TUNEL boyaması ile gösterilmiştir. İskeminin indüklenmesi ile

beraber beyne yeteri miktarda O<sub>2</sub> ve glikoz gidememektedir. Bu sebeple özellikle striatum seviyesindeki nöronlarda ciddi enerji eksiklerine neden olmaktadır. Bu enerji eksikliğine bağlı olarak hücrelerin membran potansiyellerini kaybetmesine ve hızlı bir şekilde ölmelerine neden olacaktır. Ekstraselüler ortamda biriken glutamat hasar bölgesinde glutamat toksisitesi olarak da bilinen eksitotoksositeye sebep olacaktır. Bu durumun etkisiyle glutamat bağımlı NMDA ve AMPA reseptörlerinin uyarımı gerçekleşerek hücre içerisine pozitif yüklü iyonların girmesine neden olacaktır (18). Hücre içerisine giren ikincil mesajcı olarak da bilenen Ca<sup>+2</sup> iyonunun konsantrasyonu, reaktif oksijen türlerinin artmasına, hücre membranının yapısının bozulmasına, ve Fas ölüm reseptörleri üzerinden kaspaz8 ile beraber Bid proteinini kırparak aktifleşerek tBid formuna dönüşür ve mitokondrideki ölüm mekanizmalarının aktifleşmesine neden olmaktadır (136, 137). Beyin felci sonrası uygulanan 4 mg/kg dozundaki melatonin normal atmosfer koşullarında apoptotik hücre ölümünü istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürmektedir. %70 NBO veya %100 NBO tedavileri tek başına apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir. Oksijen tedavisine bağlı olarak artan oksijen serbest radikallerinin melatonin ile kombine edilmesi durumunda hem %70 hem de %100 NBO tedavilerinin etkinliğini arttırmıştır. Özellikle en düşük DNA fragmentasyonu %100 NBO'nun melatonin ile kombine edildiğinde gözlemlenmiştir.

NBO tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar alanı, sitotoksik ödem, KBB geçirgenliği ve nörolojik duruma etkisini gözlemlmek için 90 dk OSA oklüzyonu takiben 24 saatlik reperfüzyon metodu kullanılmıştır. Hayvanların sakrifiye edilmeden önce tabi tutuldukları nörolojik değerlendirmede; normal atmosfer şartlarında (%21 NBO) melatonin tedavisi uygulanan grubun davranışlarının aynı grubun taşıyıcı enjeksiyonu yapılan farelere göre nörolojik fonksiyonlarının daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan %70 NBO tedavisinin tek başına nörolojik davranışlara bir etkisinin olmadığı ancak melatonin ile kombine edildiği zaman nörolojik fonksiyonları arttırdığı gösterilmiştir. %100 NBO uygulanmasının %21 ve %70 gruplarına kıyasla nörolojik davranışları iyileştirdiği fakat bu tedavinin melatonin ile kombine edilmesinin davranış üzerine ekstra bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Beyine giden OSA'nın tıkanması ile beraber hasarlı alanda dakikalar içerisinde hücre ölümü meydana gelmektedir. Geri döndürülemez bu hasar mekanizması 90

dakikalık deneysel beyin felci metodu ile incelenmektedir (138, 139). Sakrifiye edilen farelerden 2 mm aralıklarla alınan koronal kesitlere cresyl violet boyaması yapılmıştır. Bu boyama sayesinde yaşayan hücrelerdeki nissyl cisimcikleri boyanmıştır ve ölü hücreler boyanmamıştır. Bu boyama sayesinde beyin felci sonrasında hasar alanı tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar %21 NBO uygulanan farelerde 4 mg/kg dozundaki melatoninin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde hasar alanını azalttığını göstermiştir. Ayrıca normal atmosfer koşullarına göre %70 NBO + melatonin, %100 NBO + taşıyıcı ve %100 NBO + melatonin gruplarının hasar alanını azalttığı gösterilmiştir.

Glutamat reseptörlerinin uyarılması sonrasında hücre içerisine giren pozitif yüklü iyonlardan  $Na^{+1}$  ekstrasellüler ortamdan hücre içine  $Cl^{-1}$  iyonunun girmesine neden olmaktadır (11). Bu sebepten dolayı hücre içerisinde tuz oluşmasına ve ekstrasellüler sıvıdan hücre içerisine yüksek miktarda su girişine neden olmaktadır. Hücre içerisinde artan su miktarı hücrelerin şişmesine ve sitotoksik ödemin oluşmasına neden olmaktadır (11, 140). Oluşan sitotoksik ödem normal atmosfer koşullarında uygulanan melatonin tedavisi ile azalmaktadır. NBO tedavilerinin tek başlarına beyin ödemi düşürememektedir. Ancak NBO tedavileri melatonin ile kombine edilmesi durumunda beyin ödemi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürebilmektedir.

KBB sayesinde dolaşımdaki kan içerisinde bulunan hidrofilik ve büyük moleküllerin beyin içine girmesini engelleyerek homeostaza önemli bir katkıda bulunmaktadır (141). KBB yapısal olarak sıkı bağlar (*tight junctions*) ile birbirine bağlanmış endotel hücreler tarafından oluşturulmuştur bir bariyerdir. Beyin felci gibi patofizyolojik durumlar bu bariyerin bozulmasına neden olmaktadır (142). İskemik striatum seviyesinden alınan koronal kesitlere uygulanan IgG boyaması sonrasında KBB geçirgenliğindeki bozulma ipsilateral hemisferin kontralateral hemisfere göre oranlanması ile hesaplanmıştır. Korteks seviyesinden yapılan analizler sonucunda NBO tedavileri KBB geçirgenliğini tek başına azaltamamaktadır. Hem atmosfer koşullarında uygulanan melatonin hem de %70 ve %100 NBO + melatonin gruplarındaki KBB geçirgenliği %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltmaktadır. Striatum seviyesinden yapılan analizlerde %100 NBO tedavisi hem tek başına hem de melatonin ile kombine

edildiğinde KBB geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca hem normal atmosfer koşullarında hem de %70 NBO gruplarında tedavilerin melatonin ile kombine edildiğinde %21 NBO + taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede KBB geçirgenliğini azalttığı gözlemlenmiştir.

Oksijen tedavilerinin tek başlarına veya melatonin ile kombinasyonlarının beyin kan akımı üzerine etkileri LSI tekniği kullanılarak incelenmiştir. Beyin felci sonrasında ipsilateral hemisferde hasar alanı üç farklı bölgede incelenmektedir. Bu bölgeler beyin kan akımının neredeyse sıfırlandığı ve nekrotik hücre ölümünün baskın olduğu iskemik kor bölgesi, kan akımının kor bölgesine göre daha iyi durumda olduğu, hasar etrafı depolarizasyonların baskın olup apoptotik hücre ölümünün gözlemlendiği penumbra bölgesi ve hasarsız korteks olmak üzere üçe ayrılmaktadır. 90 dk OSA tıkanması sonrasında farelere taşıyıcı veya melatonin enjeksiyonu yapıldıktan sonra NBO tedavileri 90 dk süresince uygulanmıştır. Bu esnada beyin kan akımı takibi gerçek zamanlı olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar beyin felci sonrasında iskemik kor bölgesindeki kan akımının %70 NBO ve %100 NBO gruplarının hem taşıyıcı hem de melatonin ile kombine edildiği gruplarda attığı gösterilmiştir. Ayrıca %21 NBO grubunda tedavinin melatonin ile kombine edilmesi tedavinin etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırdığı gözlemlenmiştir. Penumbra bölgesindeki kan akımı incelendiğinde bu bölgedeki kan akımının %70 ve %100 NBO gruplarının tek başlarına veya melatonin ile kombine edildiği durumlarda kan akımının istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gösterilmiştir. Hasar sonrası hücre ölümünden etkilenmediği düşünülen fakat çeşitli hücrel aktivite sayesinde hasar alanının şekillenmesine katkıda bulunan hasarsız korteks seviyesinden yapılan analizlerde %70 NBO + melatonin ve %100 NBO + melatonin gruplarında beyin kan akımının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir.

NBO tedavilerinin ve bu tedavilerin melatonin ile kombinasyonlarının hücre içi sinyal yolları analizleri Western Blot tekniği kullanılmıştır. Beyin felci sonrasında hasarlanan hücrelerin tekrardan hayata döndürülebilmesi için PI3K sinyal yolağı önemli bir rol oynamaktadır (143). Hücre içi artan Akt protein seviyesi bir yandan hamartin ve tuberin kompleksi üzerinden mTOR aktivasyonuna neden olurken diğer taraftan GSK3'ü aktive ederek hücre büyümesini arttırmaktadır (144). Ayrıca



Bad proteini üzerinden de apoptozu sinyal yolağı üzerine direkt bir etkisi bulunmaktadır (145). Uygulanan %100 NBO tedavisi Akt protein seviyesini arttırmaktadır. %70 NBO uygulanan grup tek başına Akt seviyesini arttırmakta yetersiz kalırken tedavinin melatonin ile kombinasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Akt seviyesini arttırmaktadır. NBO tedavileri hem tek başına hem de melatonin ile kombine edildiğinde apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında apoptozu sinyal yolağı proteinleri olan apoptozu karşıtı Bcl-xL ve apoptotik bir protein olan Bax protein seviyeleri değerlendirilmiştir. %70 ve özellikle de %100 NBO tedavileri apoptozu engelleyici protein olan Bcl-xL protein seviyesini arttırırken apoptotik Bax protein seviyesini ise azaltmaktadır. Beyin felci sonrası artması beklenen NOS enzimlerinin uygulanan oksijen tedavileri ile de artması beklenmektedir. Yapılan bu çalışmada beyin felci sonrası uygulanan oksijen tedavileri beraber nNOS ve iNOS protein seviyeleri atmosfer koşullarına göre artmaktadır. Uygulanan 4 mg/kg dozundaki melatonin ise NOS aktivasyonunu geri döndürememektedir. eNOS seviyesi beyin kan akımı ile direkt ilişkili bir protein olduğu bilinmektedir. İskemi sonrası artan beyin kan akımının eNOS ile bağlantısına bakıldığında %70 NBO ve özellikle de %100 NBO + melatonin gruplarında istatistiksel olarak artan bir eNOS seviyesi gözlemlenmektedir.

## 8. SONUÇ

Tüm bu sonuçlar bir arada incelendiğinde OSA tıkanması modeli kullanılarak oluşturulan beyin felci sonrasında akut bir şekilde uygulanan %100 NBO tedavisiyle birlikte uygulanan 4 mg/kg dozundaki melatonin apoptotik hücre ölümünü, enfarktüs hacmini, beyin ödemi ve KBB geçirgenliğini azaltırken nörolojik fonksiyonların artmasını sağlamaktadır. Hücre içi sinyal yollarından p-Akt, nNOS, iNOS, eNOS ve apoptoz engelleyici Bcl-xL protein seviyelerini artırırken apoptotik Bax protein seviyesini azaltırken beyin felci sonrasında LSI tekniği ile beyin kan akımı takibi yapıldığında NBO tedavisi iskemik kor ve penumbra bölgesindeki beyin kan akımını arttırmaktadır. Bunun yanı sıra NBO tedavisinin serbest radikal yakalayıcısı olan melatonin ile kombinasyonu sinerjistik bir etki göstererek tedavinin etkinliğini daha da arttırmaktadır.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar beyin felci sonrasında farmakolojik tedavi amaçlı yeni hedef moleküllerin tespitine katkı sağlamaktadır.

## 9. KAYNAKLAR

1. Soler, EP, and Ruiz, VC. Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Current cardiology reviews* **6**, 138-149. (2010).
2. Roth, JM. Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke. *Proceedings* **24**, 257-259. (2011).
3. Siket, MS. Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Emergency medicine clinics of North America* **34**, 861-882. (2016).
4. Chen, CJ, Ding, D, Starke, RM, Mehndiratta, P, Crowley, RW, Liu, KC, et al. Endovascular vs medical management of acute ischemic stroke. *Neurology* **85**, 1980-1990. (2015).
5. Weir, NU, and Dennis, MS. Meeting the challenge of stroke. *Scottish medical journal* **42**, 145-147. (1997).
6. Caplan, LR, and Hon, FK. Clinical diagnosis of patients with cerebrovascular disease. *Primary care* **31**, 95-109. (2004).
7. Chiang, T, Messing, RO, and Chou, WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2011).
8. Catanese, L, Tarsia, J, and Fisher, M. Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circulation research* **120**, 541-558. (2017).
9. Durukan, A, and Tatlisumak, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **87**, 179-197. (2007).
10. Klehmet, J, Harms, H, Richter, M, Prass, K, Volk, HD, Dirnagl, U, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* **158**, 1184-1193. (2009).
11. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* **22**, 391-397. (1999).
12. Zechariah, A, ElAli, A, Doepfner, TR, Jin, F, Hasan, MR, Helfrich, I, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral

- ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke* **44**, 1690-1697. (2013).
13. Yao, H, Takasawa, R, Fukuda, K, Shiokawa, D, Sadanaga-Akiyoshi, F, Ibayashi, S, et al. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain research. Molecular brain research* **91**, 112-118. (2001).
  14. Astrup, J, Siesjo, BK, and Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723-725. (1981).
  15. Martin, RL, Lloyd, HG, and Cowan, AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in neurosciences* **17**, 251-257. (1994).
  16. Dirnagl, U, and Endres, M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke* **45**, 1510-1518. (2014).
  17. Camacho, A, and Massieu, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of medical research* **37**, 11-18. (2006).
  18. Shohami, E, and Biegon, A. Novel approach to the role of NMDA receptors in traumatic brain injury. *CNS & neurological disorders drug targets* **13**, 567-573. (2014).
  19. Endres, M, and Dirnagl, U. Ischemia and stroke. *Advances in experimental medicine and biology* **513**, 455-473. (2002).
  20. Hossmann, KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* **8**, 195-208. (1996).
  21. Yamasaki, Y, Matsuo, Y, Matsuura, N, Onodera, H, Itoyama, Y, and Kogure, K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke* **26**, 318-322; discussion 322-313. (1995).
  22. Doyle, KP, Simon, RP, and Stenzel-Poore, MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310-318. (2008).

23. Valko, M, Leibfritz, D, Moncol, J, Cronin, MT, Mazur, M, and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44-84. (2007).
24. Sugawara, T, and Chan, PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxidants & redox signaling* **5**, 597-607. (2003).
25. Gonzalez, B, Leroux, P, Lamacz, M, Bodenant, C, Balazs, R, and Vaudry, H. Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9627-9631. (1992).
26. Kurzepa, J, Kurzepa, J, Golab, P, Czerska, S, and Bielewicz, J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *The International journal of neuroscience* **124**, 707-716. (2014).
27. Chaturvedi, M, and Kaczmarek, L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Molecular neurobiology* **49**, 563-573. (2014).
28. Crack, PJ, and Taylor, JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free radical biology & medicine* **38**, 1433-1444. (2005).
29. Broughton, BR, Reutens, DC, and Sobey, CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-339. (2009).
30. Unal-Cevik, I, Kilinc, M, Can, A, Gursoy-Ozdemir, Y, and Dalkara, T. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 2189-2194. (2004).
31. Ginet, V, Puyal, J, Clarke, PG, and Truttmann, AC. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *The American journal of pathology* **175**, 1962-1974. (2009).
32. Zhu, C, Wang, X, Xu, F, Bahr, BA, Shibata, M, Uchiyama, Y, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell death and differentiation* **12**, 162-176. (2005).

33. Michalski, D, Hartig, W, Schneider, D, and Hobohm, C. Use of normobaric and hyperbaric oxygen in acute focal cerebral ischemia - a preclinical and clinical review. *Acta neurologica Scandinavica* **123**, 85-97. (2011).
34. Ivanov, KP, Sokolova, IB, and Vovenko, EP. Oxygen transport in the rat brain cortex at normobaric hyperoxia. *European journal of applied physiology and occupational physiology* **80**, 582-587. (1999).
35. Stover, JF. Normobaric hyperoxia--a further treatment option following traumatic brain injury? *Critical care medicine* **36**, 1697-1698; author reply 1698. (2008).
36. Poli, S, and Veltkamp, R. Oxygen therapy in acute ischemic stroke - experimental efficacy and molecular mechanisms. *Current molecular medicine* **9**, 227-241. (2009).
37. Padma, MV, Bhasin, A, Bhatia, R, Garg, A, Singh, MB, Tripathi, M, et al. Normobaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: A pilot study in Indian patients. *Annals of Indian Academy of Neurology* **13**, 284-288. (2010).
38. Rodriguez, P, Zhao, J, Milman, B, Tiwari, YV, and Duong, TQ. Methylene blue and normobaric hyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke. *Brain and behavior* **6**, e00478. (2016).
39. Shi, SH, Qi, ZF, Luo, YM, Ji, XM, and Liu, KJ. Normobaric oxygen treatment in acute ischemic stroke: a clinical perspective. *Medical gas research* **6**, 147-153. (2016).
40. Singhal, AB, Dijkhuizen, RM, Rosen, BR, and Lo, EH. Normobaric hyperoxia reduces MRI diffusion abnormalities and infarct size in experimental stroke. *Neurology* **58**, 945-952. (2002).
41. Flynn, EP, and Auer, RN. Eubaric hyperoxemia and experimental cerebral infarction. *Annals of neurology* **52**, 566-572. (2002).
42. Liu, S, Liu, W, Ding, W, Miyake, M, Rosenberg, GA, and Liu, KJ. Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **26**, 1274-1284. (2006).

43. Jiang, J, and Tyssebotn, I. Normobaric and hyperbaric oxygen treatment of acute carbon monoxide poisoning in rats. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* **24**, 107-116. (1997).
44. Haelewyn, B, Chazalviel, L, Nicole, O, Lecocq, M, Risso, JJ, and Abraini, JH. Moderately delayed post-insult treatment with normobaric hyperoxia reduces excitotoxin-induced neuronal degeneration but increases ischemia-induced brain damage. *Medical gas research* **1**, 2. (2011).
45. Geng, X, Parmar, S, Li, X, Peng, C, Ji, X, Chakraborty, T, et al. Reduced apoptosis by combining normobaric oxygenation with ethanol in transient ischemic stroke. *Brain research* **1531**, 17-24. (2013).
46. Geng, X, Fu, P, Ji, X, Peng, C, Fredrickson, V, Sy, C, et al. Synergetic neuroprotection of normobaric oxygenation and ethanol in ischemic stroke through improved oxidative mechanism. *Stroke* **44**, 1418-1425. (2013).
47. Kochanski, R, Peng, C, Higashida, T, Geng, X, Huttemann, M, Guthikonda, M, et al. Neuroprotection conferred by post-ischemia ethanol therapy in experimental stroke: an inhibitory effect on hyperglycolysis and NADPH oxidase activation. *Journal of neurochemistry* **126**, 113-121. (2013).
48. Singhal, AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurological research* **29**, 173-183. (2007).
49. Rink, C, Roy, S, Khan, M, Ananth, P, Kuppusamy, P, Sen, CK, et al. Oxygen-sensitive outcomes and gene expression in acute ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **30**, 1275-1287. (2010).
50. Lo, EH, Dalkara, T, and Moskowitz, MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 399-415. (2003).
51. Sunami, K, Takeda, Y, Hashimoto, M, and Hirakawa, M. Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery. *Critical care medicine* **28**, 2831-2836. (2000).
52. Daugherty, WP, Levasseur, JE, Sun, D, Rockswold, GL, and Bullock, MR. Effects of hyperbaric oxygen therapy on cerebral oxygenation and

- mitochondrial function following moderate lateral fluid-percussion injury in rats. *Journal of neurosurgery* **101**, 499-504. (2004).
53. Rockswold, SB, Rockswold, GL, Vargo, JM, Erickson, CA, Sutton, RL, Bergman, TA, et al. Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *Journal of neurosurgery* **94**, 403-411. (2001).
54. Liu, S, Shi, H, Liu, W, Furuichi, T, Timmins, GS, and Liu, KJ. Interstitial pO<sub>2</sub> in ischemic penumbra and core are differentially affected following transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **24**, 343-349. (2004).
55. Tolia, CM, Reinert, M, Seiler, R, Gilman, C, Scharf, A, and Bullock, MR. Normobaric hyperoxia--induced improvement in cerebral metabolism and reduction in intracranial pressure in patients with severe head injury: a prospective historical cohort-matched study. *Journal of neurosurgery* **101**, 435-444. (2004).
56. Aricigil, M, Dundar, MA, Yucel, A, Arbag, H, Arslan, A, Aktan, M, et al. Anti-inflammatory effects of hyperbaric oxygen on irradiated laryngeal tissues. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* **84**, 206-211. (2018).
57. Miljkovic-Lolic, M, Silbergleit, R, Fiskum, G, and Rosenthal, RE. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain research* **971**, 90-94. (2003).
58. Buras, JA, Stahl, GL, Svoboda, KK, and Reenstra, WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *American journal of physiology. Cell physiology* **278**, C292-302. (2000).
59. Yin, D, Zhou, C, Kusaka, I, Calvert, JW, Parent, AD, Nanda, A, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23**, 855-864. (2003).



60. Calvert, JW, Yin, W, Patel, M, Badr, A, Mychaskiw, G, Parent, AD, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain research* **951**, 1-8. (2002).
61. Vlodayvsky, E, Palzur, E, Feinsod, M, and Soustiel, JF. Evaluation of the apoptosis-related proteins of the BCL-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated by hyperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study. *Acta neuropathologica* **110**, 120-126. (2005).
62. Demchenko, IT, Boso, AE, Bennett, PB, Whorton, AR, and Piantadosi, CA. Hyperbaric oxygen reduces cerebral blood flow by inactivating nitric oxide. *Nitric oxide : biology and chemistry* **4**, 597-608. (2000).
63. Veltkamp, R, Siebing, DA, Sun, L, Heiland, S, Bieber, K, Marti, HH, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **36**, 1679-1683. (2005).
64. Nawaz, MA, Huang, Y, Bie, Z, Ahmed, W, Reiter, RJ, Niu, M, et al. Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. *Frontiers in plant science* **6**, 1230. (2015).
65. Reiter, RJ, Coto-Montes, A, Boga, JA, Fuentes-Broto, L, Rosales-Corral, S, and Tan, DX. Melatonin: new applications in clinical and veterinary medicine, plant physiology and industry. *Neuro endocrinology letters* **32**, 575-587. (2011).
66. Reiter, RJ, Tan, DX, Leon, J, Kilic, U, and Kilic, E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Experimental biology and medicine* **230**, 104-117. (2005).
67. Claustrat, B, Brun, J, and Chazot, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews* **9**, 11-24. (2005).
68. Pereira, JC, Jr., Pradella Hallinan, M, and Alves, RC. Secondary to excessive melatonin synthesis, the consumption of tryptophan from outside the blood-brain barrier and melatonin over-signaling in the pars tuberalis may be central to the pathophysiology of winter depression. *Medical hypotheses* **98**, 69-75. (2017).

69. Privat, K, Brisson, C, Jouvet, A, Chesneau, D, Ravault, JP, and Fevre-Montange, M. Evidence for implication of tryptophan hydroxylase in the regulation of melatonin synthesis in ovine pinealocytes in culture. *Cellular and molecular neurobiology* **22**, 417-429. (2002).
70. Paredes, SD, Barriga, C, Reiter, RJ, and Rodriguez, AB. Assessment of the Potential Role of Tryptophan as the Precursor of Serotonin and Melatonin for the Aged Sleep-wake Cycle and Immune Function: *Streptopelia Risor* as a Model. *International journal of tryptophan research : IJTR* **2**, 23-36. (2009).
71. Gibbs, FP, and Vriend, J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**, 1796-1798. (1981).
72. Moreno, AC, Clara, RO, Coimbra, JB, Julio, AR, Albuquerque, RC, Oliveira, EM, et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *The FEBS journal* **280**, 4782-4792. (2013).
73. Thomas, KB, Tigges, M, and Iuvone, PM. Melatonin synthesis and circadian tryptophan hydroxylase activity in chicken retina following destruction of serotonin immunoreactive amacrine and bipolar cells by kainic acid. *Brain research* **601**, 303-307. (1993).
74. Bubenik, GA, and Konturek, SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **62**, 13-19. (2011).
75. Hardeland, R. Melatonin and the pathologies of weakened or dysregulated circadian oscillators. *Journal of pineal research* (2016).
76. Scholtens, RM, van Munster, BC, van Kempen, MF, and de Rooij, SE. Physiological melatonin levels in healthy older people: A systematic review. *Journal of psychosomatic research* **86**, 20-27. (2016).
77. Tricoire, H, Moller, M, Chemineau, P, and Malpoux, B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction* **61**, 311-321. (2003).
78. Cardinali, DP, and Pevet, P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews* **2**, 175-190. (1998).

79. Jan, JE, Reiter, RJ, Wasdell, MB, and Bax, M. The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. *Journal of pineal research* **46**, 1-7. (2009).
80. Potocki, L, Glaze, D, Tan, DX, Park, SS, Kashork, CD, Shaffer, LG, et al. Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome. *Journal of medical genetics* **37**, 428-433. (2000).
81. Reiter, RJ, Reiter, MN, Hattori, A, Yaga, K, Herbert, DC, and Barlow-Walden, L. The pineal melatonin rhythm and its regulation by light in a subterranean rodent, the valley pocket gopher (*Thomomys bottae*). *Journal of pineal research* **16**, 145-153. (1994).
82. Homolak, J, Mudrovic, M, Vukic, B, and Toljan, K. Circadian Rhythm and Alzheimer's Disease. *Medical sciences* **6**(2018).
83. Roohbakhsh, A, Shamsizadeh, A, Hayes, AW, Reiter, RJ, and Karimi, G. Melatonin as an endogenous regulator of diseases: The role of autophagy. *Pharmacological research* (2018).
84. Srinivasan, V, Pandi-Perumal, SR, Cardinali, DP, Poeggeler, B, and Hardeland, R. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behavioral and brain functions : BBF* **2**, 15. (2006).
85. Kilic, E, Kilic, U, Yulug, B, Hermann, DM, and Reiter, RJ. Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator. *Journal of pineal research* **36**, 171-176. (2004).
86. Kilic, U, Kilic, E, Reiter, RJ, Bassetti, CL, and Hermann, DM. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of pineal research* **38**, 67-71. (2005).
87. Kilic, U, Yilmaz, B, Reiter, RJ, Yuksel, A, and Kilic, E. Effects of memantine and melatonin on signal transduction pathways vascular leakage and brain injury after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* **237**, 268-276. (2013).
88. Toktas, ZO, Yilmaz, B, Eksi, MS, Bayoumi, AB, Akakin, A, Yener, Y, et al. Acquired Encephalocele With Hydrocephalus and Pineal Region Epidermoid Cyst. *The Journal of craniofacial surgery* **27**, e459-461. (2016).

89. Pei, Z, Fung, PC, and Cheung, RT. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *Journal of pineal research* **34**, 110-118. (2003).
90. Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Gunal, MY, Caglayan, B, Yalcin, E, et al. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox biology* **12**, 657-665. (2017).
91. Kelestemur, T, Yulug, B, Caglayan, AB, Beker, MC, Kilic, U, Caglayan, B, et al. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neuroscience letters* **612**, 92-97. (2016).
92. Joshi, N, Biswas, J, Nath, C, and Singh, S. Promising Role of Melatonin as Neuroprotectant in Neurodegenerative Pathology. *Molecular neurobiology* **52**, 330-340. (2015).
93. Chan, PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**, 1124-1129. (1996).
94. Sonmez, M, Yuce, A, and Turk, G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive toxicology* **23**, 226-231. (2007).
95. Jimenez-Aranda, A, Fernandez-Vazquez, G, Mohammad, ASM, Reiter, RJ, and Agil, A. Melatonin improves mitochondrial function in inguinal white adipose tissue of Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research* **57**, 103-109. (2014).
96. Leon, J, Acuna-Castroviejo, D, Sainz, RM, Mayo, JC, Tan, DX, and Reiter, RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life sciences* **75**, 765-790. (2004).
97. Shi, H, Wang, X, Tan, DX, Reiter, RJ, and Chan, Z. Comparative physiological and proteomic analyses reveal the actions of melatonin in the reduction of oxidative stress in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Journal of pineal research* **59**, 120-131. (2015).

98. Reiter, RJ, Tan, DX, Osuna, C, and Gitto, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science* **7**, 444-458. (2000).
99. Tan, DX, Hardeland, R, Manchester, LC, Poeggeler, B, Lopez-Burillo, S, Mayo, JC, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *Journal of pineal research* **34**, 249-259. (2003).
100. Martin, M, Macias, M, Escames, G, Reiter, RJ, Agapito, MT, Ortiz, GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of pineal research* **28**, 242-248. (2000).
101. Pandi-Perumal, SR, Srinivasan, V, Maestroni, GJ, Cardinali, DP, Poeggeler, B, and Hardeland, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *The FEBS journal* **273**, 2813-2838. (2006).
102. Reiter, RJ, Tan, DX, Manchester, LC, and Tamura, H. Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **58 Suppl 6**, 5-22. (2007).
103. Manev, H, Uz, T, Kharlamov, A, and Joo, JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10**, 1546-1551. (1996).
104. Kilic, E, Ozdemir, YG, Bolay, H, Kelestimur, H, and Dalkara, T. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**, 511-516. (1999).
105. Cho, S, Joh, TH, Baik, HH, Dibinis, C, and Volpe, BT. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain research* **755**, 335-338. (1997).

106. Cuzzocrea, S, Costantino, G, Gitto, E, Mazzon, E, Fulia, F, Serraino, I, et al. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *Journal of pineal research* **29**, 217-227. (2000).
107. Cam, E, Yulug, B, Cengiz, N, Poelkin, E, Isyk, D, Bakar, M, et al. Melatonin: a suitable agent for depression associated with stroke? *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **20**, 498-500. (2008).
108. Letechipia-Vallejo, G, Gonzalez-Burgos, I, and Cervantes, M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Archives of medical research* **32**, 186-192. (2001).
109. Kilic, U, Yilmaz, B, Ugur, M, Yuksel, A, Reiter, RJ, Hermann, DM, et al. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia. *Journal of pineal research* **52**, 228-235. (2012).
110. Kilic, E, Kilic, U, Reiter, RJ, Bassetti, CL, and Hermann, DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *Journal of pineal research* **37**, 247-251. (2004).
111. Deniz, E, Sahna, E, and Aksulu, HE. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* **40**, 248-252. (2006).
112. Chen, HY, Chen, TY, Lee, MY, Chen, ST, Hsu, YS, Kuo, YL, et al. Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of pineal research* **41**, 175-182. (2006).
113. Guerrero, JM, Reiter, RJ, Ortiz, GG, Pablos, MI, Sewerynek, E, and Chuang, JI. Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of pineal research* **23**, 24-31. (1997).
114. Sinha, K, Degaonkar, MN, Jagannathan, NR, and Gupta, YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *European journal of pharmacology* **428**, 185-192. (2001).

115. Sun, FY, Lin, X, Mao, LZ, Ge, WH, Zhang, LM, Huang, YL, et al. Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. *Journal of pineal research* **33**, 48-56. (2002).
116. Kilic, E, Kilic, U, Reiter, RJ, Bassetti, CL, and Hermann, DM. Tissue-plasminogen activator-induced ischemic brain injury is reversed by melatonin: role of iNOS and Akt. *Journal of pineal research* **39**, 151-155. (2005).
117. Koh, PO. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *The Journal of veterinary medical science* **70**, 747-750. (2008).
118. Macleod, MR, O'Collins, T, Horky, LL, Howells, DW, and Donnan, GA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *Journal of pineal research* **38**, 35-41. (2005).
119. Liu, L, and Cheung, RT. Effects of pretreatment with a combination of melatonin and electroacupuncture in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**, 953162. (2013).
120. Liu, LF, Qian, ZH, Qin, Q, Shi, M, Zhang, H, Tao, XM, et al. Effect of melatonin on oncosis of myocardial cells in the myocardial ischemia/reperfusion injury rat and the role of the mitochondrial permeability transition pore. *Genetics and molecular research : GMR* **14**, 7481-7489. (2015).
121. Kilic, E, Kilic, U, Bacigaluppi, M, Guo, Z, Abdallah, NB, Wolfer, DP, et al. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *Journal of pineal research* **45**, 142-148. (2008).
122. 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. (2001).
123. Hori, M, Nakamachi, T, Shibato, J, Rakwal, R, Shioda, S, and Numazawa, S. Unraveling the Specific Ischemic Core and Penumbra Transcriptome in the Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion Mouse Model Brain Treated with the Neuropeptide PACAP38. *Microarrays* **4**, 2-24. (2015).

124. Plafki, C, Peters, P, Almeling, M, Welslau, W, and Busch, R. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviation, space, and environmental medicine* **71**, 119-124. (2000).
125. Camporesi, EM. Side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* **41**, 253-257. (2014).
126. Muller-Bolla, M, Collet, JP, Ducruet, T, and Robinson, A. Side effects of hyperbaric oxygen therapy in children with cerebral palsy. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* **33**, 237-244. (2006).
127. Bui, QC, Lieber, M, Withers, HR, Corson, K, van Rijnsoever, M, and Elsaleh, H. The efficacy of hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radiation-induced late side effects. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **60**, 871-878. (2004).
128. Pasban, E, Panahpour, H, and Vahdati, A. Early oxygen therapy does not protect the brain from vasogenic edema following acute ischemic stroke in adult male rats. *Scientific reports* **7**, 3221. (2017).
129. Liu, WC, and Jin, XC. Oxygen or cooling, to make a decision after acute ischemia stroke. *Medical gas research* **6**, 206-211. (2016).
130. Li, M, Zhao, J, Hu, Y, Lu, H, and Guo, J. Oxygen free radicals regulate energy metabolism via AMPK pathway following cerebral ischemia. *Neurological research* **32**, 779-784. (2010).
131. Flamm, ES, Demopoulos, HB, Seligman, ML, Poser, RG, and Ransohoff, J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* **9**, 445-447. (1978).
132. Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, AB, Turkseven, S, Gurel, B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Molecular neurobiology* **55**, 2565-2576. (2018).
133. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Kelestemur, T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Perilesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity



- after Focal Cerebral Ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 422. (2014).
134. Shahjouei, S, Cai, PY, Ansari, S, Sharififar, S, Azari, H, Ganji, S, et al. Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach. *Journal of vascular and interventional neurology* **8**, 1-8. (2016).
135. Doeppner, TR, Kaltwasser, B, Schlechter, J, Jaschke, J, Kilic, E, Bahr, M, et al. Cellular prion protein promotes post-ischemic neuronal survival, angiogenesis and enhances neural progenitor cell homing via proteasome inhibition. *Cell death & disease* **6**, e2024. (2015).
136. Sorce, S, Bonnefont, J, Julien, S, Marq-Lin, N, Rodriguez, I, Dubois-Dauphin, M, et al. Increased brain damage after ischaemic stroke in mice lacking the chemokine receptor CCR5. *British journal of pharmacology* **160**, 311-321. (2010).
137. Culmsee, C, and Kriegstein, J. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. International Symposium on Neurodegeneration and Neuroprotection. *EMBO reports* **8**, 129-133. (2007).
138. 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. *Experimental neurology* **296**, 23-31. (2017).
139. Beker, MC, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604-30614. (2015).
140. Dostovic, Z, Dostovic, E, Smajlovic, D, Ibrahimagic, OC, and Avdic, L. Brain Edema After Ischaemic Stroke. *Medical archives* **70**, 339-341. (2016).
141. Ramos, E, Patino, P, Reiter, RJ, Gil-Martin, E, Marco-Contelles, J, Parada, E, et al. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free radical biology & medicine* **104**, 32-53. (2017).
142. Krueger, M, Hartig, W, Reichenbach, A, Bechmann, I, and Michalski, D. Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. *PloS one* **8**, e56419. (2013).

143. Gao, X, Zhang, H, Steinberg, G, and Zhao, H. The Akt pathway is involved in rapid ischemic tolerance in focal ischemia in Rats. *Translational stroke research* **1**, 202-209. (2010).
144. Krymskaya, VP. Tumour suppressors hamartin and tuberlin: intracellular signalling. *Cellular signalling* **15**, 729-739. (2003).
145. Zhou, H, Li, XM, Meinkoth, J, and Pittman, RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of cell biology* **151**, 483-494. (2000).



## 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
12/02/2014	4		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Melatonin ve Normobarik Oksijen Tedavi Kombinasyonunun Beyin Felci Sonrası Nöroprotektif Rolü” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**oybirliği**” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 Yıl**

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi Özbek	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul Kılıç	
Üye	Doç. Dr. Mustafa Öztürk	
Üye	Yard. Doç. Emir Yüzbaşıoğlu	
Üye	Yard. Doç. Dr. Sine Özmen Toğay	
Üye	Taha Keleştemur	
Üye	Dr. Mehmet Yalçın Günel	
Üye	Özge Şeyda Durgut	
Üye	Ekrem Musa Özdemir	

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mustafa Çağlar	<b>Soyadı</b>	Beker
<b>Doğum Yeri</b>	Schiedam/ Hollanda	<b>Doğum Tarihi</b>	22.04.1988
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kimlik No</b>	10022204966
<b>E-mail</b>	m.caglarbeker@gmail.com	<b>Tel</b>	535 888 85 01

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
<b>Yüksek Lisans</b>	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2018
<b>Yüksek Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi	2013
<b>Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi	2012
<b>Lise</b>	Malatya Anadolu Lisesi	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl)</b>
1.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2013 -
2.			
3.			

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

<b>Yabancı Dil Sınavı Notu</b>								
YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
75								

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	70.8	58.5	68.1
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanım becerisi</b>
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi
Adobe Photoshop	Orta

## SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

1. Caglayan B, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Beker M, Kelestemur T, Sertel E, Ozturk G, Sahin F, Kilic E, (2017) “Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice” *Exp. Neurol.* 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.
2. Demirci S, Dogan A, Basak Turkmen N, Telci D, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E, Ozkan F, Dede B, Sahin F, (2017) “Poloxamer P85 increases anticancer activity of Schiff base against prostate cancer in vitro and in vivo” *Anticancer Drugs.* doi: 10.1097/CAD.0000000000000528.
3. **Beker MC**, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, Kelestemur T, Sertel E, Sahin Z, Kutlu S, Kilic U, Baykal AT, Kilic E, (2017) “Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT” *Mol Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
4. Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Yulug B, Yilmaz B, Kerman BE, Kilic E, (2017) “Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice” *Redox Biol.* 12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006.
5. Eren Z, Gunal MY, Ari E, Coban J, Cakalagaoglu F, Caglayan B, **Beker MC**, Akdeniz T, Yanikkaya G, Kilic E, Kantarci G, (2016) “Pleiotropic and Renoprotective Effects of Erythropoietin Beta on Experimental Diabetic Nephropathy Model”. *Nephron* 132:292-300. doi: 10.1159/000444649.
6. Kartal O, Aydinöz S, Kartal AT, Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Karademir F, Suleymanoglu S, Kul M, Yulug B, Kilic E (2016) “Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3”. *Metabolic brain disease.* 31(4):827-35. doi: 10.1007/s11011-016-9816-z.
7. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E (2016) “Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of

melatonin and memantine”. *Neuroscience letters* 612:92-97. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.043.

8. **Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E (2015) “Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation”. *Oncotarget* 6:30604-30614. doi: 10.18632/oncotarget.5773.
9. Kilic E, Reitmeir R, Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kelestemur T, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM (2014) “HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia”. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:422. doi: 10.3389/fncel.2014.00422.

#### **Uluslararası hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar**

1. Poster- **Beker MC**, Caglayan AB, Yalcin E, Kilic U, Baykal AT, Gurel B, Kilic E, “Proteomic Approach To Circadian Rhythm After Brain Injury”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. 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.
3. 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.
4. Poster- Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Elibol B, Beker M, Altug-Tasa B, Ozcicek I, Ozen M, Yilmaz B, Kilic E, “Melatonin Promotes Stroke Recovery By Stimulating Axonal Projections And Neurogenesis”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

5. 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.
6. Poster- Kilic U, **Beker MC**, Caglayan AB, Elibol B, Karakas M, Altug B, Gok O, Kelestemur T, Kilic E, “Melatonin promotes neurological recovery, perilesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
7. 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.
8. Poster- Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Ozturk G, Kilic E “The role of neuronal expression of P2X7 receptors in the processes of brain injury in mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
9. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Inhibition but not activation of P2X7 receptors improves brain epileptiform activity in mice: Role of iNOS activation” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
10. Poster- **Beker MC**, Caglayan AB Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E, “Roles of oxygen treatment in the development of ischemic brain injury, signal transduction and brain microcirculation after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
11. Poster- Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E “The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates melatonin’s neuroprotective activity after focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.
12. Poster- Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Kilic E “Roles of P2X7 receptors in neuronal injury after optic nerve transaction and focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.

## Ulusal hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Sözlü Sunum- Keleştemur T, Çağlayan AB, **Beker MC**, Çağlayan B, Yalçın E, Sertel E, Kılıç E, “Beyin Felci Sonrası Gelişen Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopik Teknikleri ile İncelenmesi” 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya, 2017.
2. Sözlü Sunum- **Beker MC**, Çağlayan AB, Keleştemur T, Çağlayan B, Yalçın E, Dalay A, Altunay A, Sertel E, Kilic E, “Effects of Circadian Rhythm on Brain Injury and Related Molecular Mechanisms” 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 20/32, Düzce, 2016.
3. Sözlü Sunum- Keleştemur T, **Beker MC**, Çağlayan AB, Yalçın E, Altunay S, Dalay A, Sertel E, Dilden A, Çağlayan B, Kilic E, “Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/ Turkey, 2016.
4. Poster- Yalçın E, Çağlayan AB, **Beker MC**, Keleştemur T, Çağlayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kilic E, “The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress , PC108, Düzce/Turkey, 2016.
5. Poster- Kilic U, Elibol B, **Beker MC**, Çağlayan AB, Tasa-Altug B, Beker M, Ozen B, Yılmaz B, Kilic E, “Plasticity-Promoting Effect of Melatonin After Experimental Cerebral Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC112, Düzce/Turkey, 2016.
6. Poster- Çağlayan AB, **Beker MC**, Çağlayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Keleştemur T, Yalçın E, Kilic U, Saarma M, Kilic E, “Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016
7. Sözlü Sunum- Çağlayan AB, Yalçın E, **Beker MC**, Çağlayan B, Keleştemur T, Oztürk G, Kilic E “In vivo ve in vitro P2X7 receptörü aracılı nöronal sağkalım mekanizması” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.



8. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
9. Poster- **Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Caglayan B, Kilic E “Melatonin ve normobarik oksijen tedavisinin reperfüzyon hasarına etkileri” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
10. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptör baskılanması ve aktivasyonunun beyin epileptiform aktivitesi, mikrodolaşımı ve hücre içi sinyal iletim molekülleri üzerine olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
11. Poster- **Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Normobarik oksijen tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar, sinyal mekanizmaları ve beyin kan dolaşımına olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014
12. Sözlü sunum- Kilic U, Gok O, Karakas M, Elibol B, **Beker MC**, Caglayan AB, Kilic E “İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmeyi sağlayan plastisiteye bağlı moleküler mekanizmalarda melatoninin etkinliğinin araştırılması” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
13. Sözlü sunum- Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Yilmaz B, Kilic E “Sıçanlarda memantin ve melatonin tedavisinin travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin araştırılması” 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2013.
14. Poster- Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E, Kilic U “P2X7 reseptörlerinin fare optik kesisi ve fokal iskemi modelleriyle oluşturulan nöronal hasar üzerine etkisi” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.
15. Poster- Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E “Fosfatidil inozitol-3 kinaz/AKT sinyal yolağının Melatoninin iskemi sonrası nöroprotektif etkisinde rolü” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.
16. Sözlü sunum- Seker FB, Kilic U, Caglayan AB, Ekimci N, Cevreli B, **Beker MC**, Demirci S, Dogan A, Yilmaz B, Kilic E “Profiklaktik olarak uygulanan 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Redüktaz İnhibitörlerinin penisilinle indüklenen beyin epileptik aktivitesine etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.

17. Sözlü-sunum- Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu, Caglayan AB, **Beker MC**, Ekimci N, Kilic E “3-Hydroxy-Methykgkutaryl Coenzyme A reductase inhibitörü rosuvastatinin beyin felci sonrası beyin plastisitesi ve onarım üzerine olan etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.4.5

