



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYİN FELCİ SONRASI MELATONİN VE BMAL 1
PROTEİNİN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF SERTEL

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2018



*“Bu tez
Dedem Sami SERTEL’e ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgisini, emeğini, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen her konuda cesaretlendiren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca REMER Araştırma Merkezimizin yöneticisi Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e bize sağladığı imkanlardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans süresi boyunca hiçbir zaman desteklerini eksik etmeyen, ihtiyacım olduğu her zaman işime kendi işleri gibi koşan , beni yetiştiren ve bir ömür boyu minnettar kalacağım Mustafa Çağlar BEKER'e, Ahmet Burak ÇAĞLAYAN'a, Berrak ÇAĞLAYAN'a, Esra YALÇIN'a, Taha KELEŞTEMUR'a ve bu huzurlu çalışma ortamı için hepsine çok teşekkür ediyorum.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ekip arkadaşlarım Aysun DİLDEN'e, Serdar ALTUNAY'a, Arman DALAY'a, Reyda KARAÇAY'a, Zeynep BALÇIKANLI'ya, Nilay ATEŞ'e, Mehmet Özgen ALTINTAŞ'a teşekkür ederim.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen MEDİTAM ailesine; Ekrem M. ÖZDEMİR, Ali ŞENBAHÇE teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim anneme, babama, kardeşim Eslem SERTEL'e, tüm aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
TABLoların LİSTESİ	xii
1- ÖZET	1
2- ABSTRACT	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ	3
4-GENEL BİLGİLER	5
4.1. Beyin Felci	5
4.1.1. Beyin Felci Tedavisinin Klinik Başarısızlığının Nedenleri	6
4.1.2. Beyin Felci Patofizyolojisi	6
4.1.2.1. Eksitotoksisite	6
4.1.2.2. Perienfark depolarizasyon	7
4.1.2.3. Enflamasyon.....	7
4.1.2.4. Hücre Ölümü.....	8
4.2. Melatonin	10
4.2.1. Melatonin sentezlenmesi, salgılanması ve yıkımı.....	10
4.2.2. Melatonin reseptörleri	11
4.2.3. Melatoninin antioksidan etkisi	11
4.3. Beyin felci ve melatonin ilişkisi.....	12
4.4. Biyolojik Ritimler	12
4.4.1. Sirkadyen ritim.....	13
4.4.1.1. Zeitgeber terimi ve sirkadyen zamanı	13
4.4.1.2. Suprakiazmatik çekirdek	14
4.4.1.3. Periferel dokular ve sirkadyen ritim.....	15

4.4.1.4. Sirkadyen ritmin moleküler mekanizması	16
4.4.1.5.Sirkadyen ritim bozukluğunda görülen fizyolojik değişiklikler ve hastalıklar	18
4.5. Melatoninin ve Sirkadyen Ritim	19
4.6. Fostotidilinositol-3-Kinaz (PI3K) /Akt Hücre Sinyal Yolağı	19
4.6.1. PI3K /Akt hücre sinyal yolağı moleküler mekanizması	20
4.6.2. Wortmannin.....	20
4.7. PI3K /Akt Hücre Sinyal Yolağı ile Beyin Felci Arasındaki İlişki	21
4.8. PI3K /Akt Hücre Sinyal Yolağı ile Melatonin Arasındaki İlişki	22
5-MATERYAL VE METOT.....	23
5.1. Deneysel Dizaynı ve Deneysel Gruplar.....	23
5.2. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli	24
5.3. Beyin İçi Enjeksiyon	26
5.4. İntraperitoneal Enjeksiyon	26
5.5. Deneysel Sonlandırılması.....	27
5.6. İmmunofluoresan	27
5.6.1. İmmunofluoresan boyamalar için kesit alınması	27
5.6.2. DNA fragmantasyonu analizi.....	27
5.6.3. Nöronal sağkalım analizi	28
5.7. Protein Çalışmaları ve Western Blot.....	28
5.7.1. Protein izolasyonu	28
5.7.2. Protein konsantrasyon ölçümü	29
5.7.3. Protein örneklerinin hazırlanması	29
5.7.4. Western blot	29
5.7.5. Stripleme	30
5.7.6. Western blot değerlendirilmesi	31
5.8. Melatonin Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi.....	31
5.9. Oksijen – Glikoz Deprivasyonu (OGD).....	31
5.10. Bmal 1 Protein İfadesinin Artırılması	32
5.11. İstatistik	33

6-BULGULAR	34
6.1. Beyin Kan Akımının Ölçülmesi.....	34
6.2. DNA Fragmantasyonu ile Apoptotik Hücre Analizi.....	35
6.3. Nöranal Sağkalımın Değerlendirilmesi.....	36
6.4. Western Blot ile Protein Analizleri	37
6.4.1. Western blot ile p-Akt proteini analizi.....	38
6.4.2. Western blot ile Bmal 1 proteini analizi	39
6.4.3. Western blot ile Clock proteini analizi.....	40
6.4.4. Western blot ile Per-I proteini analizi	41
6.4.5. Western blot ile Per-II proteini analizi.....	42
6.5. Bmal 1 Proteinin Melatonin İle Değişiminin Değerlendirilmesi	42
6.6. OGD'nin Bmal 1 Proteini Üzerine Olan Etkileri	44
6.6.1. OGD'nin hücreSEL sağkalıma etkisi	45
6.6.2. OGD sonrası Bmal 1 protein seviyesinin western blot ile değerlendirilmesi ..	46
6.7. Bmal 1 Protein İfadesinin Artırılması ve OGD Sonrası Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	47
6.7.1. Bmal 1 protein klonlamasının kontrolü.....	48
6.7.2. Bmal 1 protein ifadesinin artırılması.....	49
6.7.3. Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerin OGD sonrası hücreSEL sağkalıma etkisinin değerlendirilmesi	50
6.7.4. Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerin OGD/hipoksi sonrası p-Akt protein seviyesinin değerlendirilmesi	51
7-TARTIŞMA	52
8-SONUÇ	56
9-KAYNAKLAR	57
10-ETİK KURUL ONAYI	73
11-ÖZGEÇMİŞ	74

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
Bmal1	Brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen-1
CK1 ϵ	Kazein kinaz 1 epsilon
CK1 δ	Kazein kinaz 1 delta
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
Clock $\Delta 19/\Delta 19$	Clock 19 delesyonu
Cry	Kriptokrom
CT	Sirkadyen zamanı
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GPCRs	G protein reseptörleri
IGF1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL	İnterlökin
ILK	İntegrin bağımlı kinazın
LDF	Lazer Doppler flowmetri
NMDA	N-metil-D-aspartat
PBS	Fosfat tamponlu salin
PER	Periyot
PFA	Paraformaldehit
PI3K	Fosfotidilinositol-3-Kinaz
PIP2	Fosfotidilinositolfosfat 2
PIP3	Fosfotidilinositolfosfat 3
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu silinmiş kromozom 10
REV-ERB	Retinoikasit ilişkili nüklear reseptör ailesi
ROR	Retinoid ilişkili orphan reseptör ailesi
RORE	Retinoikasit ilişkili orphan reseptör response element
RTH	Retinahipotalamik yol
RTK	Tirozin kinaz reseptörü
TNF	Tümör nekroz faktörü

T-PA	Doku plazminojen aktivatörü
TUNEL	Terminal transferase biotinylated-dUTP nick end labeling
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ZT	Zeitgeber zamanı



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1.2.1 Beyin felci sürecinde gerçekleşen patofizyolojik olayların zamana bağlı değişimi.....	10
Şekil 4.1.2.2 Beyin felci sürecinde gerçekleşen patofizyolojik mekanizmalar	10
Şekil 4.2.1.1 Melatonin sentez basamakları.....	12
Şekil 4.4.1.2.1 Suprakiazmatik çekirdeğin retinohipotalamik yol ile ilişkisi ve düzenlediği fonksiyonlar	16
Şekil 4.4.1.4.1 Sirkadyen ritmin moleküler mekanizması.....	19
Şekil 4.6.1.1 PI3K/Akt hücre sinyal yolağının moleküler mekanizması.....	21
Şekil 5.1.1 Deney dizaynı.....	24
Şekil 5.2.1 Orta serebral arter tıkanması modeli.....	26
Şekil 5.3.1 Beyin içi enjeksiyon koordinatları.....	27
Şekil 6.1.1 Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı	35
Şekil 6.2.1 Apoptotik hücre analizi	36
Şekil 6.3.1 Nöronal sağkalım analizi.....	38
Şekil 6.4.1.1 p-Akt protein seviyesi analizi	39
Şekil 6.4.2.1 Bmal 1 protein seviyesi analizi.....	40
Şekil 6.4.3.1 Clock protein seviyesi analizi.....	41
Şekil 6.4.4.1 Per-I protein seviyesi analizi	42
Şekil 6.4.5.1 Per-II protein seviyesi analizi	43
Şekil 6.5.1 Melatonin doz uygulanmasından sonra Bmal 1 protein ifadesindeki değişim.	44
Şekil 6.5.2 Melatonin uygulanmasından sonra Bmal 1 protein ifadesindeki değişim.....	45
Şekil 6.6.1.1 Melatoninle beraber OGD sonra hücresel sağkalım analizi	46
Şekil 6.6.2.1 Melatoninle beraber OGD sonra Bmal 1 protein seviyesi analizi	47
Şekil 6.7.1.1 Bmal 1 geninin PCR ile çoğaltılmasının kontrolü	49
Şekil 6.7.1.2 İfadesi arttırılmış Bmal 1'in restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek agaroz jelde kontrol edilmesi.....	49
Şekil 6.7.2.1 . Bmal 1 protein ifadesinin arttırılması ile protein seviyesinde meydana gelen değişim.	50
Şekil 6.7.3.1 Bmal 1 protein ifadesinin arttırılması sonrası yapılan OGD'nin hücresel sağkalıma etkisi.....	51

Şekil 6.7.4.1 Bmal 1 protein ifadesinin arttırılması sonrası yapılan OGD'nin p-Akt protein seviyesine etkisi52



TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 5.10.1 Bmal 1 PZR Primeleri Dizaynı34

Tablo 5.10.2 Bmal 1 geni için oluşturulan PZR basamakları34



1. ÖZET

BEYİN FELCİ SONRASI MELATONİN VE BMAL 1 PROTEİNİN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Canlılar çevrelerinde meydana gelen değişikliklere adapte olabilmek için davranışsal ve fizyolojik süreçlerini düzenlerler. Canlılardaki bu süreçler sirkadyen ritimle düzenlenmekte ve çevresel değişikliklere senkronize olmaktadır. Bu senkronizasyon canlılara bazen avantaj bazen de dezavantaj sağlamaktadır. Dezavantajlarla beraber nörodejeneratif, hastalıklar meydana gelmektedir. Sirkadyen ritme bağlı olarak bireylerde meydana gelen beyin felci vakaları da değişiklik göstermektedir. Buna bağlı olarak beyin felci insidansına bakıldığında insidansın gündüz saatlerinde daha fazla olduğu görülmektedir. Fakat beyin felci ve sirkadyen ritim arasındaki ilişkiden sorumlu mekanizmaların nasıl ilerlediği henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, beyin felci sonrası sirkadyen ritim proteinlerinden Brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen-1(Bmal 1)'in melatonin ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla *in vivo* ortamda beyin felci oluşturulan farelerde ve *in vitro* ortamda beyin felci modeli oluşturularak i) apoptotik hücre ölümü, ii) nöronal sağkalım, iii) sirkadyen ritimde rol oynayan sinyal iletim yolları, iv) Akt sinyal iletim yolağındaki değişiklikler ve v) Bmal 1'in ifadesinin artırılmasıyla hücre içerisinde etkilenen moleküler yollar değerlendirilmiştir. İskemik beyin felci modeli uygulanan farelerde iskemi sonrası melatonin tedavisi ile apoptotik hücre sayısının azaldığı, nöronal sağkalım oranının arttığı, Bmal 1, Clock, PerII ve p-Akt protein seviyelerinde artış olduğu; öte yandan Akt sinyal yolağının baskılanması ile bu proteinlerin seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Bmal 1 proteini ve melatonin arasındaki ilişkinin PI3K/Akt hücresel sağkalım sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiğine işaret etmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar sirkadyen ritmin beyin felci sonuçları üzerine etkisini moleküler düzeyde göstermektedir ve ileride beyin felcinin patolojik süreçlerinin daha detaylı anlaşılmasına ve beyin felci tedavisinde yeni hedef molekül geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Serebral iskemi, Bmal 1, Melatonin, Akt sinyal yolağı

2. ABSTRACT

RESEARCH OF THE RELATIONSHIP BETWEEN MELATONIN AND BMAL 1 PROTEINS AFTER CEREBRAL ISCHEMIA

Living organisms organize their behavioral and physiological processes in order to adapt to the changes that occurs around them. In living organisms, these processes organized by circadian rhythm and synchronized with environmental changes. This synchronizing provide sometimes advantages and sometimes disadvantages. Neurodegenerative, metabolic, cardiovascular diseases consist of disadvantages. Based on the circadian rhythm, cerebral ischemia cases vary among individuals. Therefore the incidence of cerebral ischemia is seen to be higher during daytime hours. However, how these circadian rhythm mechanisms are related with cerebral ischemia is not clear. In this thesis, it is aimed to reveal the relationship between Bmal 1, circadian rhythm protein, and melatonin after cerebral ischemia.

For this purpose, i) apoptotic cell death, ii) neuronal survival, iii) signaling pathways that play a role in the circadian rhythm, iv) Akt signaling pathway, v) the effects of overexpression of Bmal 1 protein in vivo and in vitro conditions have been researched in order to understand possible effects of circadian rhythm related protein Bmal 1 on cerebral ischemia. As a result of in vivo and in vitro experiments, it was found that melatonin treatment decreased number of apoptotic cells, increased rate of neuronal survival, and resulted in higher expression levels of circadian rhythm related proteins Bmal 1, Clock, PerII and survival ptotein p-Akt., while suppression of Akt signaling pathway leads to a decreased in the levels of these proteins relative to treatment after cerebral ischemia. According to data, we purpose the relationship between Bmal 1 protein and melatonin is mediated through the PI3K/Akt cellular survival signaling pathway.

Keywords: Cerebral Ischemia, Bmal 1, Melatonin, Akt Cell Signalling Pathway

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin felci, Dünya genelinde en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir. Beyin felci kaynaklı ölümlerin oranı batı ülkelerinde %10-12 iken bu ölümlerin %12'si 65 yaş altı bireyde meydana gelmektedir. Yaş, cinsiyet, aile geçmişi, sahip olduğu diğer çeşitli hastalıklara bağlı olarak bireyde kalıcı etkiler de meydana getirmektedir (1-3). Beyin felcinin bugüne kadar klinikte uygulanan tek tedavi yöntemi, beyin felci başlangıcından sonraki ilk 3 - 4,5 saat içinde verilen rekombinant doku plazminojen aktivatörü (r-TPA) olmakla beraber bilinen başka tedavi yöntemi yoktur (4-6). Doku plazminojen aktivatörü tedavisinin uygulama süresi kısıtlı olduğundan tedaviden faydalanabilecek hastaların sayısı azdır (7). Beyin felcini önlemek için bugüne kadar yapılan klinik araştırmalar ve nöroprotektif tedaviler başarısız olmuştur. Bu başarısızlığın nedenlerinden birinin beyin felciyle başlayan mekanizma zincirlerinin iyi anlaşılabilmesi ve mekanizmaların tedavi kombinasyonlarıyla ilişkilendirilememesi olduğu düşünülmektedir (8). Canlılarda davranışsal ve fizyolojik süreçleri düzenleyen sirkadyen ritim ile çevresel değişiklikler senkronize haldedir. Bu ritim sayesinde canlılar çevrelerinde meydana gelen değişikliklere adapte olabilmektedir (9, 10). Her ne kadar bu adaptasyonların avantajları olsa da fizyolojik ve davranışsal olumsuz etkilere de sebep olabilmektedir. Bu olumsuz etkiler sonucunda kardiyak, metabolik bozulmalar ve beyin felci gibi hastalıklar görülebilmektedir. Bireylerde görülen beyin felci vakaları da sirkadyen ritme bağlı olarak değişiklik göstermektedir (11). Günün her anında beyin felci geçirme riski olsa da beyin felci vakalarının görülme sıklığının sabah saatlerinde en yüksek olduğu bilinmektedir (12, 13). Buna karşın, 00:00-06:00 saatleri arasında beyin felci insidansı en düşük seviyededir (13). Sirkadyen ritmin moleküler bileşenlerinden olan Bmal 1, nöroprotektif moleküllerin düzenlenmesinde rol oynayarak iskemik hasar mekanizmalarının oluşmasını engellemeye yardımcı olduğu düşünülen bir proteindir (14). Fakat bununla birlikte, sirkadyen ritim ile beyin felci patofizyolojik mekanizmaları arasındaki moleküler ya da hücresel iletişim mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (15).

Bu tez çalışmasında sirkadyen ritim proteinlerinden Bmal 1'in yine sirkadyen ritmi düzenleyen en önemli nöropeptidlerden olan ve nöroprotektif etkisi bilinen

melatonin ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, in vivo ortamda beyin felci oluşturulan farelerde ve in vitro ortamda beyin felci modeli oluşturularak i) apoptotik hücre ölümü, ii) nöronal sağkalım, iii) sirkadyen ritimde rol oynayan sinyal iletim yolları, iv) Akt sinyal iletim yolağındaki değişimler ve v) Bmal 1'in ifadesinin artırılmasıyla hücre içerisinde etkilenen moleküler yollar değerlendirilmiştir. Bmal 1 sirkadyen ritim proteininin melatonin ile olan etkileşimi ve bu etkileşime bağlı hücresel değişikliklerin özellikle beyin felci gibi karmaşık bir patofizyolojiye sahip bir durumdaki rolü bilinmemektedir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların ışığında beyin felci sonrası melatonin ve Bmal 1 proteini arasındaki ilişkinin ortaya konulmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Bmal 1 proteininin Akt hücresel sağkalım sinyal yolağı üzerinden iskemik mekanizmalarla olan ilişkisi açığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar sirkadyen ritmin beyin felci sonuçları üzerine etkisini moleküler düzeyde göstermektedir ve ileride beyin felcinin patolojik süreçlerinin daha detaylı anlaşılmasına ve beyin felci tedavisinde yeni hedef molekül geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beyin Felci

Beyin felci, beyni besleyen damarların tıkanması veya hemorajı sonrasında serebral kan akımının düşmesine bağlı olarak görülen kompleks patofizyolojik süreçler bütünüdür (16). Morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olan beyin felci, her yıl 75.000'den fazla kişiyi etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kalp hastalığı ve kanserden sonra üçüncü sırada yer alan ölüm nedenidir (17-19). Her yıl Amerika ve Batı Avrupa'da meydana gelen ölümlerin %7-15'inden sorumludur. Ayrıca beyin felci sonrası bireylerin kas hareketlerinde fonksiyonel kayıplar, konuşma zorluğu, düşünme eyleminde zorluk yaşama gibi geçici ve kalıcı etkiler de görülmektedir. Kesin bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte tek tedavi yöntemi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylı, beyin felci başlangıcından sonraki ilk 3 - 4,5 saat içerisinde verilen "doku plazminojen aktivatörü"dür (4, 6). Doku plazminojen aktivatörünün iskemik başlangıcından sonraki geç dönemlerde verilmesinin zararlı etkiler doğurması nedeniyle, hastaların büyük bir çoğunluğu var olan tek tedavi yönteminden de yararlanamamaktadır. İskemik beyin felci ve hemorajik beyin felci olmak üzere 2 tip beyin felci vardır. İskemik felç, beyin felci vakalarının %85'ini oluşturmaktadır. İskemik beyin felcinde üç farklı mekanizma söz konusudur. Bunlardan birincisi sistematik bir süreçten dolayı beyindeki kan akışı değişimidir. İkincisi beyin damarlarının genellikle trombolitik tıkanma benzeri olaylarla tıkanmasıdır. Üçüncüsü ise beyni besleyen damarların embolik olarak tıkanmasıdır (2). Hemorajik felç ise, beyin felci vakalarının %15'ini oluşturmasına rağmen beyin felcinin sebep olduğu ölümlerin %30'undan sorumludur. Hemorajik felç, kan damarlarının zayıflaması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Damarlarda meydana gelen malformasyonlardan dolayı damar çevresindeki alanlarda kanamalar meydana gelmektedir. Hemorajik inmenin temel nedeni kontrol edilemeyen hipertansiyona bağlı kan basıncıdır (20).

4.1.1. Beyin felci tedavisinin klinik başarısızlığının nedenleri

Beyin felci tedavisi için yapılan çalışmaların ve tedaviye yönelik ilaç uygulamalarının çoğu başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Hayvan deneylerinde yapılan tedavi yaklaşımli çalışmaların birçoğunda oluşan hasar azaltmasına rağmen klinik çalışmalarda aynı başarıya ulaşılamamaktadır (21). Beyin felcinin hemen sonrasında ilk tedavi süresinin kısıtlı olması başarısızlığın nedenlerinden bir tanesidir. Bireylerin yaşı ve yaşa bağıli olarak bireyde halihazırda var olan hastalıklarla beraber risk faktörlerinin artması bir diğeri sebeptir (21). İnsan ve hayvan beyin yapılarının morfolojik ve fonksiyonel olarak birbirinden farklı özellikler taşıması veya ilaçların vücuttaki yan etkileri başarısızlığa sebep olan diğeri faktörlerdir (21).

4.1.2. Beyin felci patofizyolojisi

Yetişkin insan beyni vücudun toplam %2'sini oluşturmasına rağmen vücuda alınan oksijen ve glikozun %20'sini tüketmektedir. İnsanda normal serebral kan akımı 50 ml/100 g/ dk'dır. Serebral kan akımının azalmasıyla (15 ml/100 g/dk) nöronların ihtiyacı olan oksijen ve glikoz yeterli miktarda sağlanamamakta ve patofizyolojik mekanizmalar devreye girmektedir (22-25). Beyin felcinin patofizyolojik süreçlerinde ekzitotoksisite, peri enfarkt depolarizasyon, enflamasyon ve hücre ölümü yer almaktadır (Şekil 4.1.2.1 ve Şekil 4.1.2.2).

4.1.2.1. Eksitotoksisite

Yüksek miktarda oksijen ve glikoz tüken beyin dokusu, enerji ihtiyacını oksidatif fosforilasyonla karşılamaktadır. Serebral kan akımının azalması veya kesilmesi ile beyne yeterli miktarda glikoz ve oksijen gidememekte ve enerji eksikliği meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hücre zarı zar potansiyelini kaybetmektedir. Nöron ve glia hücreleri depolarize olmaktadır (26, 27). Presinaptik nöronda voltaj kapılı kalsiyum kanalları (Ca^{+2}) aktif hale gelmektedir. Glutamat gibi ekzitator amino asitler ekstrasellüler boşluğa salınmaktadır. Aynı zamanda enerji eksikliği nedeniyle ekzitator amino asitler presinaptik nörona geri alınamamakta ve ekstrasellüler boşlukta glutamat birikimi artmaktadır. Bu olay ekzitotoksisite olarak adlandırılmaktadır (26, 27). Aşırı glutamat aktivasyonu ile birlikte glutamat, N-

metil- D-aspartat (NMDA) ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA) kainat reseptörlerinden hücre içerisine girmektedir. Glutamat nörotransmitter özelliğinden dolayı hücrede uyarıcı etki göstermektedir. Hücre içerisine sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) monovalent iyon girişi olmaktadır. Bu iyon girişini su girişi takip etmekte ve ödem meydana gelmektedir. Aynı zamanda glutamat uyarımı ile hücre içerisine evrensel sekonder mesajcı olan kalsiyum (Ca^{+2}) girmektedir (21). Kalsiyum girişi ile hücre sitoplazmasında ve çekirdeğinde hasar oluşum mekanizmaları başlatılmaktadır. Proteolitik enzimlerin aktivasyonu sonucu hücre iskeleti proteinlerini yıkıma uğraması veya reaktif oksijen türlerinin harekete geçirilmesi bu olaylardan bazılarıdır (28-30).

4.1.2.2. Perienfark depolarizasyon

İskemik dokuda, merkez (*core*) ve penumbra olmak üzere iki temel hasar bölgesi görülmektedir. Sınırları tam olarak çizilemeyen bu iki bölgeden merkez bölgesi, iskeminin en şiddetli görüldüğü bölgedir. Bu bölgede bulunan oksijen ve glikoz hızla azalmaktadır. Enerji depoları hızla tükendiğinden bu bölgedeki hücreler nekroza uğramaktadır. Penumbra bölgesi, merkezin etrafında oluşan iskemik alana verilen addır. Bu bölgede kan akımı azalmasına karşın devam ettiği için hasar merkez bölgesindeki kadar şiddetli değildir. Apoptoz ile hücre ölümleri meydana gelmektedir. Enerji eksikliğinde depolarize olan nöronlar ve glialar, potasyum (K^+) ve glutamat salınımı gerçekleştirmektedir. Merkez bölgesindeki hücreler depolarizasyon sonrasında hiçbir zaman repolarize olamazken, penumbra bölgesindeki hücreler repolarize olabilmektedir. Merkez bölgesinden başlayarak penumbra bölgesine kadar yayılan bu tekrarlı depolarizasyona perienfarkt depolarizasyon denilmektedir (31).

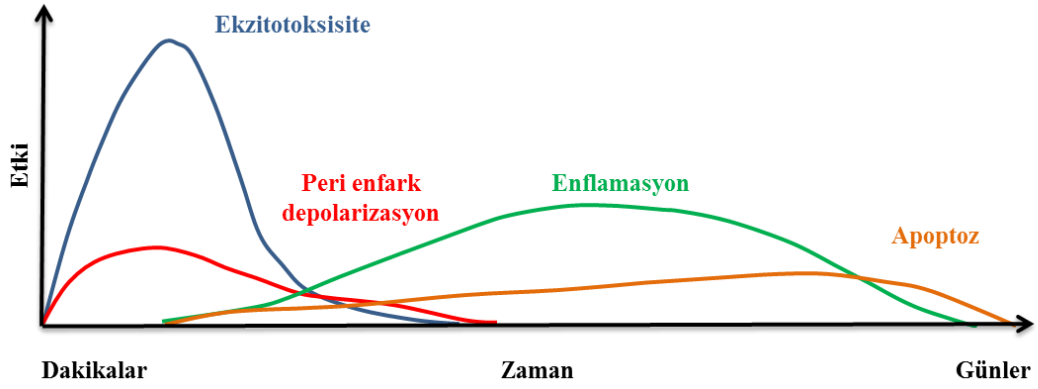
4.1.2.3. Enflamasyon

Glutamat uyarımı ile hücre içerisine evrensel sekonder mesajcı olan Ca^{+2} iyonu girmektedir. Hücre içinde aşırı Ca^{+2} birikmesine bağlı olarak serbest oksijen radikalleri artmaktadır. Serbest oksijen radikalleri pro-enflamatuar genlerin anlatımını tetiklemektedir. Bunun sonucunda hücreler tarafından tümör nekrosis faktör alfa ($\text{TNF}\alpha$), interlökin-1 β (IL-1 β) gibi enflamasyon düzenleyiciler

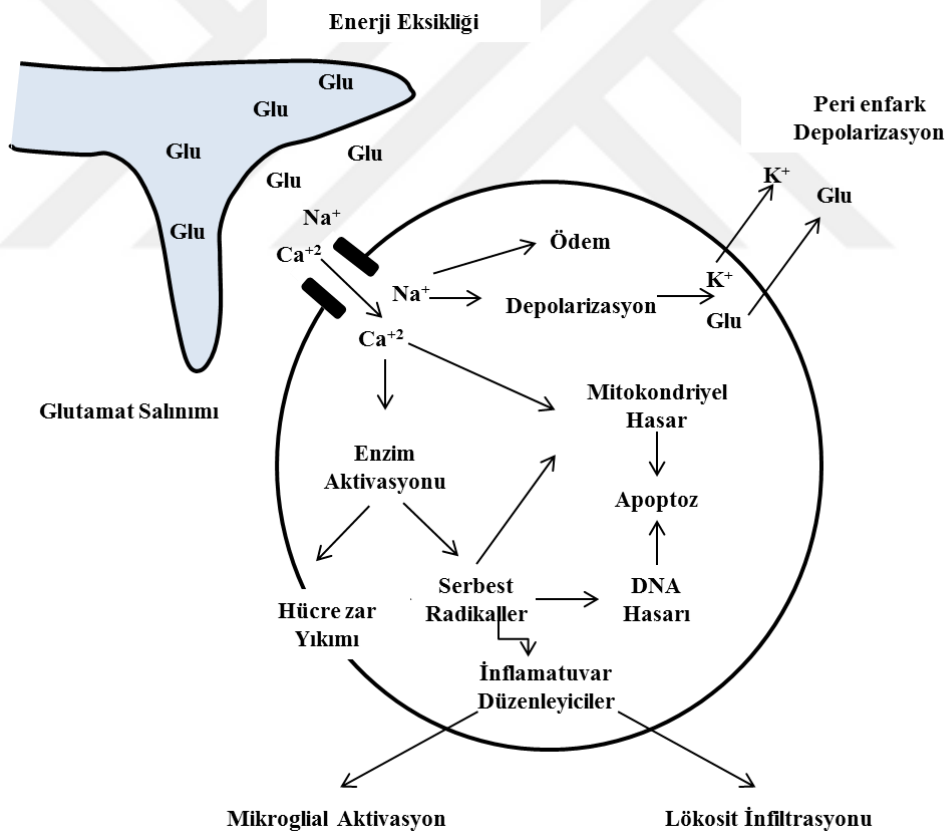
salgılanmaktadır. Nötrofiller hücre yüzey adezyon molekülleri ile ilişki kurarak damar endotelinden beyin parankimine geçmektedir. Makrofajlar ve monositler de nötrofilleri takip ederek iskemik alana göç etmektedir (32-35). Kemokinler ise iskemik alanda üretilmekte ve enflamatuar hücrelerin hedef bölgelere yönlendirilmesinde görev almaktadırlar (36, 37).

4.1.2.4. Hücre Ölümü

Beyin hücreleri aşırı glutamat aktivasyonu, Ca^{+2} birikimi, oksijen radikalleri oluşumu ve meydana gelen DNA hasarı sonucu nekroza ya da apoptoza uğramaktadır (38). İskeminin akut fazında nekroz baskın hücre ölüm mekanizmasıdır. İskemiden 30 dakika sonra merkez bölgesindeki hücreler, kromatin yapılarını yoğunlaştırarak apoptoza uğramaktadır. Hücre ölümünde rol alan ve iskeminin hem erken hem de geç fazında anlatımı devam eden kaspaz proteinleri kesilmekte ve homeostazı bozarak hücreleri öldürmektedir (39). Apoptotik hücre ölümü intrinsik kaspaz bağımlı apoptoz yolağı ve ekstrinsik kaspaz bağımlı apoptoz yolağı olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. İntirinsik kaspaz bağımlı apoptoz yolağında, hasarlı hücrede mitokondri tarafından proapoptotik faktör olan sitokrom c salınmaktadır. Sitokrom c ise sitoplazmada apaf-1 ve kaspaz-9 ile birlikte kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive ederek apoptozun başlamasına öncülük etmektedir (40, 41). Ekstrinsik kaspaz bağımlı sinyal yolağında ise, ekstrasellüler Fas ligandlarının bağlanması ile kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktif hale geçmekte; bu da kaspaz-3'ü doğrudan etkinleştirmektedir. Sitokrom c salımını indükleyen Bid/Bax aktivasyonu ile apoptoz mekanizmaları başlatılmaktadır (42).



Şekil 4.1.2.1. Beyin felcinde meydana gelen patofizyolojik olayların zamana bağlı değişimi.



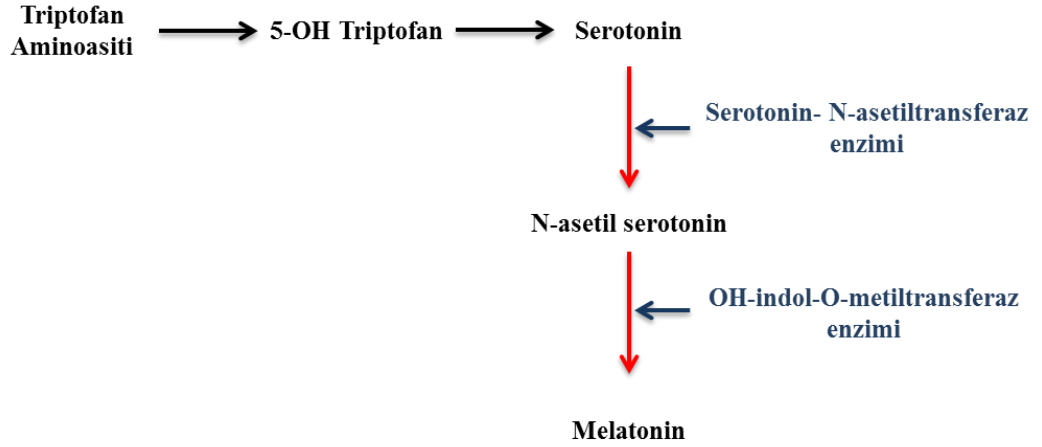
Şekil 4.1.2.2. Beyin felci sürecinde gerçekleşen patofizyolojik mekanizmalar.

4.2. Melatonin

Kimyasal adı N-asetil-5-metoksitriptamin olan melatonin hormonu pineal bezde pinealosit hücreleri tarafından salgılanmaktadır (43). Vücutta fizyolojik olarak birçok düzenlemede görev almaktadır. Antioksidan etkisi ile serbest radikalleri uzaklaştırması, anti-enflamatuar ve anti-karsinojenik özelliği, sirkadyen ritmi ve uyku/uyanıklık döngüsünü düzenlemesi, mevsimsel üremenin kontrol edilmesi bunlardan bazılarıdır (44, 45).

4.2.1. Melatonin sentezlenmesi, salgılanması ve yıkımı

Melatonin, bir esansiyel amino asit olan triptofandan sentezlenmektedir (46). Triptofan, pineal bez tarafından plazmadan alınmaktadır. Triptofan hidroksilaz enzimi ile ilk ara basamak olan 5-hidroksitriptofan oluşturulmaktadır. Daha sonra 5-hidroksitriptofan biyokimyasal reaksiyonlarla bir nörotransmitter olan serotonine dönüştürülmektedir. Serotonin; N-asetiltransferaz enzimi ile N-asetilserotonine, N-asetilserotonin ise Hidroksiindol-o-metiltransferaz ile melatonine dönüşmektedir (47) (Şekil 4.2.1.1). Işık, pineal bezden melatonin sentezlemesini sağlayan temel düzenleyicidir. Melatonin sentezi, ışıkla birlikte baskılanmaktadır (48). Serotoninin enzimlerle melatonine dönüştürülmesi nedeniyle gece serotonin sentezinde düşüş, melatonin sentezinde ise artış görülmektedir. Melatonin salgılanma hızı yaklaşık 30 mg/gün'dür. 02:00-04:00 saatlerinde maksimum seviyede salgılanırken 07:00-09:00 saatlerinde salgılanması bazal seviyeye düşmektedir (49). Melatonin yıkımı karaciğerde gerçekleşmektedir. Önce karaciğerde 6-hidroksimelatonine sonra art arda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon zincirleri ile sülfat ve glukronid türevlerine dönüştürülerek idrardan atılmaktadır (50).



Şekil 4.2.1.1. Melatonin sentez basamakları.

4.2.2. Melatonin reseptörleri

Melatoninin MT1 ve MT2 olmak üzere iki farklı reseptörü vardır. Bu reseptörler G-protein eşli reseptör (GPCR) tipindedir (51-53). Hücre zarında bulunan melatonin reseptörleri retina, beyin, suprakiazmatik çekirdek, pineal bez, serebral arter, periferal arter, böbrek, pankreas, immün hücreler gibi birçok yapıda bulunmaktadır (51, 54, 55). MT1 (350 amino asit) ve MT2 (362 amino asit) reseptörlerinin amino asit dizileri %60 homolog olmasına karşın kromozomal yerleşimleri farklıdır (56, 57).

4.2.3. Melatoninin antioksidan etkisi

Melatonin, miyokardiyal iskemi, nöronal ve diğer çeşitli hastalıklar sonucu meydana gelen serbest radikalleri (OH^\cdot , O_2^\cdot , H_2O_2) ortadan kaldırarak antioksidan özellik göstermektedir. Üstelik bu antioksidan özelliğini reseptör aracılı düzenleme olmayan bir mekanizma ile gerçekleştirmektedir. Böylece dokularda meydana gelebilecek hasarı önlemektedir (58-61). Tek bir melatonin molekülü yüksek derecede toksik olan reaktif oksijen, nitrojen ve hidroksil radikallerini nötralize etme özelliğine sahiptir (62).

4.3. Beyin Felci ve Melatonin ilişkisi

Pineal bezden salgılanan, fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda görev alan melatonin serebral hasar alanını azaltarak nöroprotektif etki sağlamaktadır (63). Aynı zamanda serbest radikal temizleyecilerle birlikte iskemi sonrası meydana gelen serbest reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltarak apoptozu inhibe etmektedir (64). İmmünomodülatör özelliği de olan melatonin iskemi sonrası anjiyogenezi ve iyileşme sürecini düzenlemektedir (65). Beyinde ödem oluşumunu ve iskemi sonrası oluşabilecek nörolojik belirtileri de azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (66).

4.4. Biyolojik Ritimler

Tüm organizmalar, dışarıdan gelen uyarılardan etkilenmektedir. Bu uyarılar organizmalarda genellikle döngüsel bir patern göstermektedir. Biyolojik ritimler, tek bir hücrede, insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde belirli bir paternde öngörülebilir ve düzenli tekrar eden değişikliklerdir. Canlıların biyolojik ritmi, ışığın günlük ve mevsimsel döngüsüne, sıcaklığa, besin maddelerine ve çevresel koşullara göre periyodik olarak değişiklik göstermektedir. Bu ritmik değişiklikler canlılar için bir avantaj sağlamakla beraber aynı zamanda hayatta kalım sürelerini de arttırmaktadır (67). Biyolojik ritimler döngülerine göre “sirkadyen, ultradiyen, infradiyen ve sirkaannual” ritimler olmak üzere 4 farklı alt gruba ayrılmaktadır.

- Sirkadyen Ritimler: Günlük tekrarlanan biyolojik ritimlerdir. Çevresel uyarılarla beraber hücre içinde biyokimyasal sinyal ağlarıyla sirkadyen periyot oluşturulmaktadır (68). Uyku döngüsü, sindirim salgıları, kan basıncı, vücut sıcaklığı, hormonların günlük periyodik salınımı birer sirkadyen ritim örneğidir(67).
- Ultradiyen Ritimler: Her 2-6 saatlik periyotta yinelenen ritimlerdir(69). Ultradiyen Ritimler fonksiyonel sirkadyen ritme ve ışık/karanlık döngüsüne bağlı değildir. Vücutta yaklaşık 3 saatte bir büyüme hormonunun salgılanması, solunum frekansı, kalp atım hızı ultradiyen ritim örnekleridir (67, 70).
- İnfiradiyen Ritim: 24 saatten daha uzun süren genellikle haftalık ya da aylık gerçekleşen biyolojik ritimlerdir. Kadınlarda aylık gözlemlenen menstürasyon döngüsü bir infiradiyen örneğidir.

- Sirkannual Ritim: Mevsimsel ve yıllık gerçekleşen ritimlerdir. Göç ve kış uykusu birer sirkaannual ritim örneğidir (67).

4.4.1. Sirkadyen ritim

Sirkadyen ritimler, çok çeşitli fizyolojik ve davranışsal ritimleri 24 saatlik zaman dilimi içerisinde düzenleyen biyolojik ritimlerdir (71, 72). Bu zaman döngü sistemi, Latince yaklaşık bir gün anlamına gelen “*circa diem*” kelimesinden ortaya çıkmaktadır (73). Sirkadyen ritim, sadece omurgalı türlerde değil aynı zamanda *Drosophila melanogaster*, bitki, mantar, siyanobakteri gibi birçok türde de gözlemlenen biyolojik bir döngüdür (74). Bu biyolojik ritim tüm organizmalarda hemen hemen aynı özelliklere sahiptir (73). Sirkadyen sistemin iki temel karakteristik özelliği bulunmaktadır (75):

- 1) Işık/karanlık döngüsü gibi dış faktörlerdeki salınımlardan bağımsız olarak devam eden yaklaşık 24 saatlik bir endojen ritmik bir yapı göstermesi karakteristik özelliklerinden birincisidir.
- 2) Işık/ karanlık döngüsü ya da besin alımı gibi dış faktörlerle zamanlamayı değiştirmesi diğer karakteristik özelliğidir.

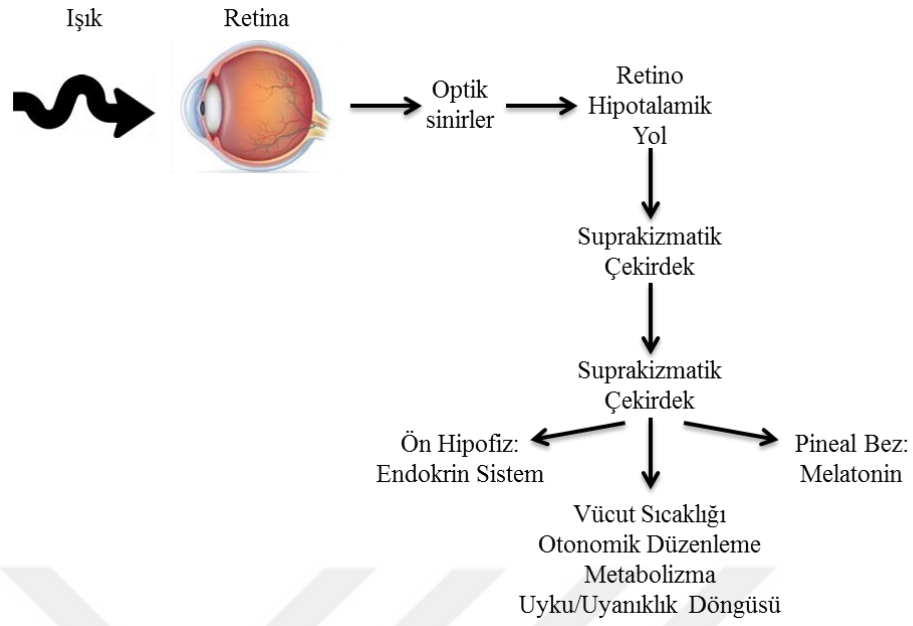
4.4.1.1. Zeitgeber terimi ve sirkadyen zamanı

Almanca bir kelime olan “Zeitgeber” sirkadiyen sistemin senkronize edebileceği veya tutabileceği her türlü çevresel gösteriyi tanımlayan “zaman verici” anlamına gelmektedir. Işık, en önemli Zeitgeber örneğidir. Bunu yanı sıra başka bir Zeitgeber örneği olarak sıcaklık gösterilebilir (76). Laboratuvar koşullarında deney hayvanlarının günlük ışık/karanlık periyodu yapay olarak kontrol altında tutulmaktadır. Bundan dolayı Zeitgeber terimi deneysel ışık/karanlık döngüsü olarak da tanımlanmıştır. Işık/karanlık döngüsü 12 saat ışık 12 saat karanlığa denktir ve Zeitgeber 0 (ZT0) ışığın açılması, Zeitgeber 12 (ZT12) ise ışığın kapanması anlamına gelmektedir (77). Günlük gerçekleşen sirkadyen ritimleri tanımlamak için gün 24 saatlik sirkadyen zaman (CT) dilimlerine bölünmektedir. Her bir saat dilimi bir sirkadyen zaman anlamına gelmektedir. Işık/karanlık döngüsüne (LD 12:12) göre sirkadyen zaman 0 (CT0) ve sirkadyen zaman 12 (CT12) endojen zaman dilimi

olarak tanımlanmaktadır. Döngünün ilk yarısı aydınlık evreyi (CT0-CT12) , ikinci yarısı karanlık evreyi (CT12-CT24) temsil etmektedir. Kemirgenlerin bazılarının lokomotor aktivitesi sirkadyen döngünün ikinci yarısı olarak tanımlanan karanlık evrede (CT12-CT24) harekete geçmektedir (78).

4.4.1.2. Suprakiazmatik çekirdek

Suprakiazmatik çekirdek, anterior hipotalamusta optik kiazmanın üstünde ve üçüncü ventrikülün yanında bulunan binlerce nöronun (insanlarda yaklaşık 50.000, sıçanda yaklaşık 20.000) oluşan ikili bir yapıdır (79-81). Sirkadyen ritmi suprakiazmatik çekirdek düzenlemektedir. Bu yüzden “ana sirkadyen saat” denilmektedir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda suprakiazmatik çekirdeğin sirkadyen ritmi düzenlemek için nöronal ateşlemeyi başlattığı belirtilmiştir (82-84). Suprakiazmatik çekirdek periferik dokularda periferik sirkadyen salınımların koordine edilmesinden de sorumludur (71, 72). Önemli bir Zeitgeber olan ışık, fotosensitif retinal gangliyon hücreleri, rod hücreleri ve koni hücreleri tarafından algılanmaktadır. Bu sinyal retino-hipotalamik yolla (RTH) suprakiazmatik çekirdeğe iletilmektedir (85, 86). Suprakiazmatik çekirdekte ışık, nöronal ve humoral sinyallere dönüştürülmekte ve bu sinyaller vücuttaki sıcaklık, aktivite seviyesi, hormon salımı gibi çeşitli ritimleri etkilemektedir (87). Yine hipotalamik projeksiyonlarla uyku/uyanıklık döngüsü de suprakiazmatik çekirdek tarafından düzenlenmektedir (Şekil 4.4.1.2.1).



Şekil 4.4.1.2.1. Suprakiazmatik çekirdeğin retinohipotalamik yol ile ilişkisi ve düzenlediği fonksiyonlar.

4.4.1.3. Periferel dokular ve sirkadyen ritim

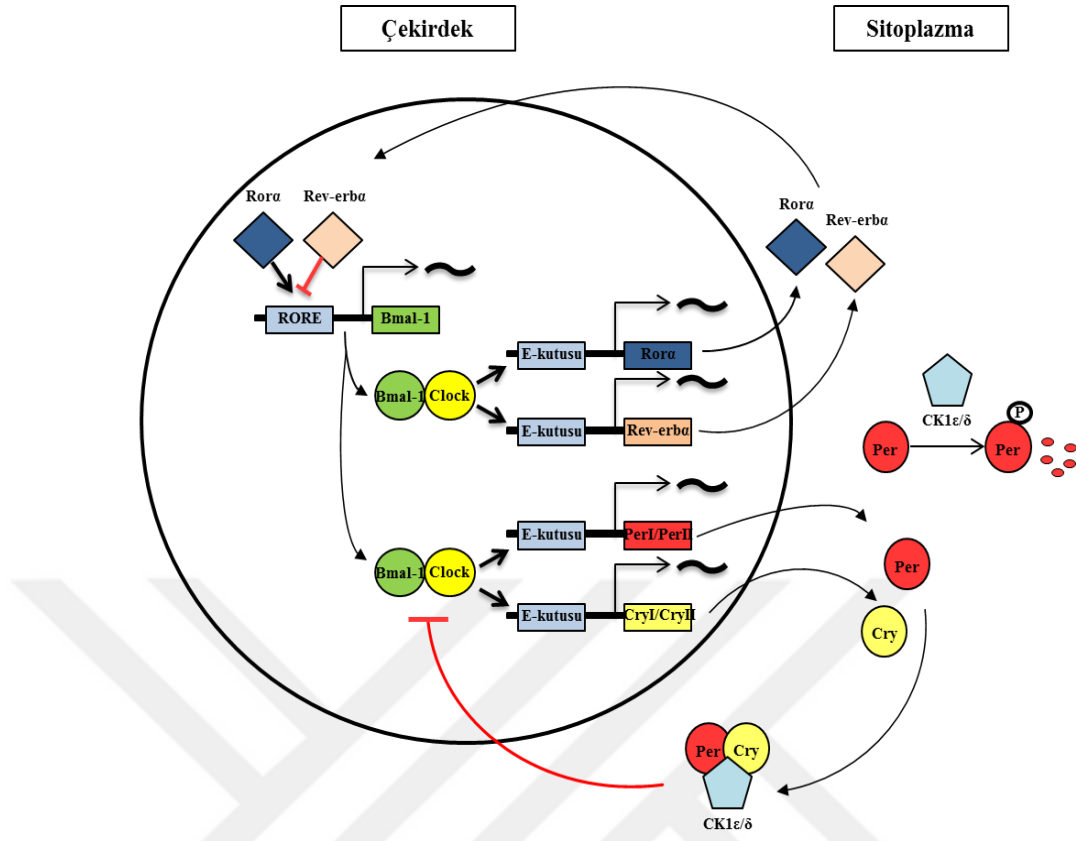
Yapılan deneysel çalışmalar, suprakiazmatik çekirdek dışında periferel dokularında kendilerine özgü sirkadyen ritmi olduğunu göstermektedir (71, 72, 88-91). Sirkadyen ritmin temel birçok bileşeni suprakiazmatik çekirdek ve periferel dokularda aynı olmasına rağmen periferel dokularda bazı farklılıklar görülmektedir. Örneğin, Circadian locomotor output cycles kaput (Clock) geninin mRNA anlatımı suprakiazmatik çekirdekte devamlı yapılırken periferel ritimlerde sadece döngü içinde yapılmaktadır (78). Retinoid ilişkili öksüz reseptör (Ror) ailesi üyelerinden olan Rora, suprakiazmatik çekirdekte güçlü salınım modeli gösterirken periferel dokularda zayıf salınım göstermektedir (92-94). Yine Ror γ , suprakiazmatik çekirdekte salınım göstermezken periferel dokularda ritmik bir anlatım göstermektedir (93, 94). Yine Clock homozigot mutantlarda Bmal 1 RNA ritmi suprakiazmatik çekirdekte yapılmazken periferel dokularda az bir seviyede de olsa devam etmektedir (95). Sirkadyen ritimde, dokuya özgü Brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen-1 (Bmal 1) düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bmal 1 eksikliğinde (Bmal 1^{-/-}) kilo kaybı, infertilizasyon, kısa yaşam süresi gibi

değişiklerin görülmesinin yanı sıra periferik ritim kaybının da olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (96-99).

4.4.1.4. Sirkadyen ritmin moleküler mekanizması

Sirkadyen ritminin giriş sinyali (çevresel uyarılar), sirkadyen ritim üreticileri ve çıkış sinyali olmak üzere üç temel bileşeni vardır (73). Giriş sinyalleriyle beraber sirkadyen ritim genleri harekete geçmektedir. Genler, sirkadyen ritmin üretilmesi ve düzenlenmesi ile ilgili proteinlerin üretimini gerçekleştirmektedir. Ritimler moleküler düzeyde, transkripsiyonun ve translasyonun birbirine bağlı pozitif ve negatif geri bildirim döngüsüne sirkadyen ritim genlerinin katılması ile art arda meydana gelen mekanizmalardan oluşmaktadır (100-102). 24 saat içerisinde gerçekleşen bu mekanizmalar transkripsiyon, translasyon, protein-protein etkileşimleri, fosforilasyon, çekirdek translokasyonu ve protein yıkımı olaylarının koordine olmasıyla ritimleri oluşturmaktadır (78). Memelilerde temel sirkadyen ritim genleri Clock (*Circadian locomotor output cycles kaput*) ve Bmal 1 (*Brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen-1*; ya da diğer adıyla *Mop3* ya da *Arntl*)'dir. Bu genler, basit heliks-kıvrım-heliks (bHLH)-PAS (*Periyot-Arnt-Single-minded*) transkripsiyon faktör ailesinin üyeleridir (97, 103, 104). Clock mRNA ve protein anlatımı suprakiazmatik çekirdekte sürekli olarak devam ederken, Bmal 1 anlatımı gece maksimum seviyeye ulaşmaktadır (105). Clock ve Bmal 1 buldukları PAS bölgesi sayesinde hücre sitoplazmasında Clock:Bmal 1 heterodimer oluşturmaktadır. Heterodimer form hücre çekirdeğine giderek Periyot (PerI, II, III) ve Kriptokrom (CryI, II) genlerinin promotör bölgesindeki *cis*-düzenleyici E-kutusu dizilerine bağlanmaktadır. Böylece Per ve Cry genlerinin anlatımı başlatılmaktadır (97, 103, 104, 106, 107). Per ve Cry proteinleri çekirdekten sitoplazmaya geçmektedir. Per ve Cry proteinleri sitoplazmada içerdikleri PAS bölgeleri sayesinde Per:Cry heterodimeri oluşturmaktadır. Bu Per:Cry heterodimer formu çekirdeğe geri dönerek Clock:Bmal 1 tarafından yapılan kendi transkripsiyon ürününün oluşmasını engellemektedir. Clock:Bmal 1 heterodimerinin gerçekleştirdiği bu döngü bir negatif geri bildirim döngüsüdür (102, 106, 108-110). Clock:Bmal 1 heterodimeri çekirdekte retinoikasit ilişkili nükleer reseptör ailesi üyelerinden olan Rev-erb α ve Ror α 'nın promotör bölgesindeki E-

kutusu dizisine bağlanarak reseptörlerin anlatımını başlatmaktadır (92, 94, 111, 112). Rev-erba ve Rora reseptörlerinin yapısında retinoikasit ilişkili öksüz reseptör yanıt elementi (RORE) bulunurken RORE aynı zamanda Bmal 1'in promotör bölgesinde de bulunmaktadır. Rev-erba ve Rora sitoplazmadan çekirdeğe giderek Bmal 1'in promotöründeki RORE dizisine bağlanmak için yarış haline geçmektedir. Rora, Bmal 1'in transkripsiyonunu aktive ederken Rev-erba, Bmal 1 transkripsiyonunu baskılamaya çalışmaktadır. Böylece Bmal 1'in sirkadyen salınımı Rev-erba ve Rora tarafından hem pozitif hem de negatif olarak düzenlenmektedir (92-94, 111). Sirkadyen ritmin otoregülatör geri bildirim döngüsünün tamamlanması yaklaşık 24 saat sürmektedir. Bu döngü fosforilasyon ve ubikütinasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar tarafından yönetilmektedir (113-117). Kazein kinaz 1 epsilon (CK1 ϵ) ve kazein kinaz 1 delta (CK1 δ), Clock ve Bmal 1 protein yıkımını düzenleyen kritik faktörlerdendir (113-115, 117). CK1 ϵ ve CK1 δ sitoplazmada Per:Cry heterodimerini fosforlamaktadır. Fosforlanan heterodimer çekirdeğe girerek Clock:Bmal 1 proteinlerinin yıkımını gerçekleştirmektedir (108, 113, 115, 118-120) (Şekil 4.4.1.4.1).



Şekil 4.4.1.4.1. Sirkadyen ritmin moleküler mekanizması.

4.4.1.5. Sirkadyen ritim bozukluğunda görülen fizyolojik değişiklikler ve hastalıklar

Sirkadyen ritim bozuklukları kardiyovasküler hastalıklar, uyku/uyanıklık döngüsü, vücut sıcaklığı, metabolizma, hormon salgılanması gibi birçok fizyolojik değişikliklere ve hastalıklara sebep olmaktadır (116, 117). Yapılan çalışmalarda Clock $\Delta 19/\Delta 19$ farelerin normal farelere göre her gün daha az uyuduğu görülmektedir. Ayrıca bu mutant farelerde hiperglisemi, hiperleptinemi, hiperinsülinemi gibi metabolik bozukluklarının olduğu da gözlemlenmiştir (121, 122). Deneysel çalışmalarda, ailesel uyku bozukluklarının PerII ve CK1 δ genlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilişkisi olduğu belirtilmektedir (116, 117). Embriyonik fibroblast hücreleri ile yapılan çalışmada, Bmal 1 eksikliğinde hücrelerin adiposit hücrelerine farklılaşmasının başarısızlık ile sonuçlandığı görülmektedir (99). İleri uyku fazı sendromu, gecikmiş uyku faz sendromu, vardiya değişimi sendromu, hızlı zaman

dilimi değişikliği sendromu (jetlag) sirkadyen ritmin bozulması ile ilişkili olan hastalıklara birer örnektir (123).

4.5. Melatoninin ve Sirkadyen Ritim:

Melatoninin ritmi, sirkadyen ritmi de düzenleyen suprakiazmatik çekirdek tarafından kontrol edilmektedir (124, 125). Işık/karanlık bilgisinin retinal gangliyonik hücrelerden geçerek suprakiazmatik çekirdeğe gelmesiyle pineal bezden melatonin salgısının başlamasına ya da sonlandırılması karar verilmektedir (126, 127).

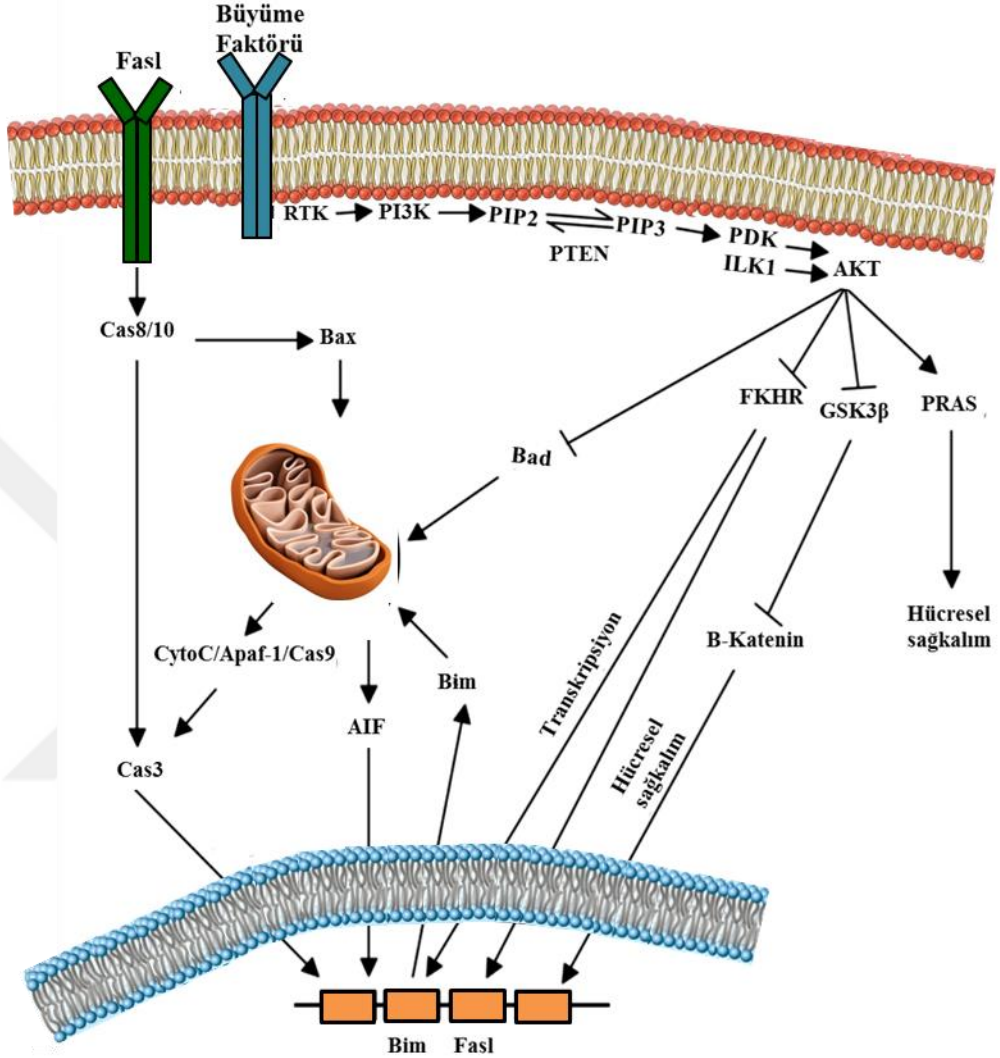
4.6. Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K) /Akt Hücre Sinyal Yolağı

PI3K/Akt sinyal yolağı apoptoz, hücreyel sağkalım, proliferasyon, hücre iskeletinde değişim ve diğer aktivitelere önemli biyolojik fonksiyona sahip bir hücreyel sağkalım ve anti-apoptotik sinyal iletim yoludur (128).

4.6.1. PI3K /Akt hücre sinyal yolağı moleküler mekanizması

Hücreyel sağkalım, proliferasyon gibi temel olaylarda görev olan Akt sinyal yolağının ilk basamağı, büyüme faktörü gibi bir uyarıcının tirozin kinaz reseptörünü (RTK) aktive etmesidir (129). RTK daha sonra fosfatidilinositol-3-kinazı (PI3K) aktive etmektedir. Aktive olan PI3K, fosfatidilinositolfosfat 2' yi (PIP₂) uyararak fosfatidilinositolfosfat 3'ün (PIP₃) fosforlanmasını sağlamaktadır. Akt aktivitesinin Ser 473 (P-Akt) ve Thr 308'in fosforilasyonu ile düzenlendiği bilinmektedir (129, 130). Fosfatidilinositol bağımlı protein kinazlardan (PDK) PDK1, direkt olarak Thr 308 bölgesinden fosforlama yaparken dolaylı olarak Ser 473 bölgesinden de fosforlama yaparak Akt aktivitesini düzenlemektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda integrin bağımlı kinazın da (ILK) Ser 473 bölgesini fosforile ederek p-Akt seviyesini arttırdığı görülmüştür (131, 132). Akt sinyal yolağının aktive olması ile apoptozda görevli Bcl-2 ve Bad gibi proteinler baskılanmaktadır (129) (şekil 4.6.1.1). Akt sinyal yolağının inaktivasyonu ise fosfataz ve tensin homoloğu silinmiş kromozom 10 (PTEN) tarafından PIP₃'ün PIP₂'ye defosforile olmasıyla gerçekleşmektedir. (şekil 4.6.1.1) Akt sinyal yolağı temel olarak fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP₃)

tarafından düzenlenmekle beraber, Ca^{+2} /kalmudilin bağımlı kinaz ve cAMP/PKA kompleksi tarafından da düzenlenebilmektedir (133, 134).



Şekil 4.6.1.1. PI3K/Akt hücre sinyal yolağının moleküler mekanizması.

4.6.2. Wortmannin

Wortmannin fungal bir metabolittir. PI3K enzimleri ve bu enzimlerle ilişkili olan diğer enzimleri için güçlü ve seçici bir baskılayıcıdır (135). Wortmannin, PI3K'nın p110 katalitik altbirimine bağlanmakta ve enzimi geri dönüşümsüz olarak baskılamaktadır. (IC_{50} , 2-4 nM) (136). DNA onarımını, reseptör aracılı endositozu ve hücre proliferasyonunu engellemektedir (137).

4.7. PI3K /Akt Hücre Sinyal Yolağı ile Beyin Felci Arasındaki İlişki

PI3K/Akt hücre sinyal yolağı, nörodejenaratif hastalıklara karşı geliştirilen koruma mekanizmalarının bir parçasını oluşturmaktadır (138, 139). Akt fosforilasyonun iskemik olmayan beyinde çeşitli hücresele metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesi için yapıldığı bilinmekle beraber iskemi ile p-Akt (Ser 473 veya Thr 308) fosforilasyonu artmaktadır (139). İskemi süresince bu fosforlanan bölgelerle Akt aktivitesi düzenlenmektedir. Ser 473 bölgesinden fosforlanması Akt aktivitesini uyarmak için yeterli olmazken Thr 308 bölgesinden fosforlanması Akt aktivasyonu için gereklidir (140-143). Fokal iskemi modellerinde, p-Akt (Ser 473) genellikle iskemi başlangıcından sonra defosforile edilmektedir. Reperfüzyondan sonra tekrar fosforilasyon başlamakta ve geçici olarak 1 - 9 saatte kadar p-Akt seviyesi yükselmektedir. İskemik penumbrada reperfüzyondan 24 saat sonra p-Akt seviyesi azalmaya başlamaktadır (144). p-Akt (Ser 473) seviyenin artması, iskemiye karşı nöroprotektif bir etki sağlamaktadır(139). PI3K/Akt yolunun fosforilasyonu hipoksik koşullar altında mitokondriyal fonksiyonu stabilize etmekte ve Bcl-xL aktivasyonu, kaspaz-3 ve p53'ün inhibisyonu yoluyla nöronları hasara karşı korumaktadır (133, 145). İskemik hasar oluşturan serbest reaktif oksijen türlerini yok eden radikal oksijen temizleyiciler, Akt sinyal yolağı üzerinden bu işlemi gerçekleştirmektedir(139). Alzheimer, Parkinson, beyin felci gibi hastalıkların oluşturduğu beyin hasarlarına karşı nöroprotektif bir etki gösteren östrojen hormonun bu koruyucu etkiyi p-Akt seviyesini arttırarak Akt sinyal yolağı üzerinden yaptığı gösterilmiştir (146-149). Ayrıca PI3K/Akt yolu, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), eritropoietin, beyinden türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerinin nöroprotektif etkilerine aracılık etmektedir (133, 139, 150).

4.8. PI3K /Akt Hücre Sinyal Yolağı ile Melatonin Arasındaki İlişki

Melatoninin hücre sel sağkalıma etkisi, PI3K/Akt yolu ile gerçekleşmektedir (151). Melatonin, Akt'nin fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) aktivasyonunu sağlayarak bu işle mi gerçekleştirmektedir (150, 152-154). Melatonin, astrositlerde p-Akt'nin fosforilasyonunu başlatmaktadır. Nöronal sağkalım için kritik bir adım olan melatonin, melatonin reseptörleri üzerinden Akt'nin aktivasyonuna neden olmaktadır (155-158).

Sonuç olarak, beyin felci sonrası melatonin ve Bmal 1 proteini arasındaki ilişkinin ortaya konulmasına katkı sağlanması beklenmektedir. Bmal 1 proteinin Akt hücre sel sağkalım sinyal yolağı üzerinden iskemik mekanizmalarla olan ilişkisi açığa kavuşturulmaya çalışılmaktadır. Sirkadyen ritmin beyin felci üzerine moleküler düzeyde etkisinin anlaşılmasına katkı sağlanması beklenilmektedir.

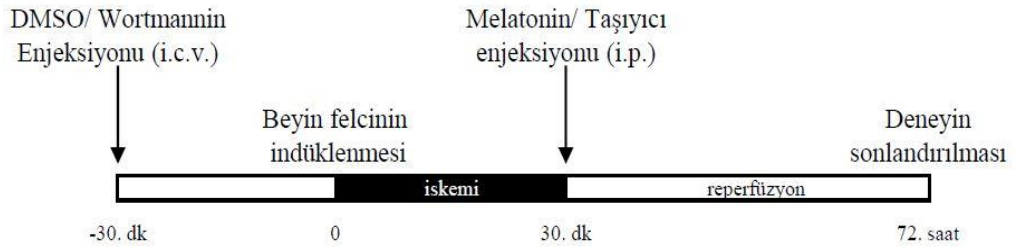
5. MATERYAL VE METOT

5.1. Deney dizaynı ve deneysel gruplar

Deneysel süresince yapılan tüm işlemler ve müdahaleler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneysel Yönel Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır. Deneysel 8-12 haftalık 20-25 gram ağırlığında erkek Balb/c fareler kullanılmıştır. Deneysel öncesinde ve sonrasında fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde uygun koşullarda tutulmuştur. Fareler çalışma içindört gruba ayrılmıştır. Grupların ayırım işlemi rastgele olacak şekilde yapılmıştır. Deneysel iki set olarak dizayn edilmiştir. Set-I: Apoptoz ve immunohistokimya çalışmaları ve Set-II: Protein çalışmalarını göstermektedir (Şekil 5.1.1).

Deneysel Grupları;

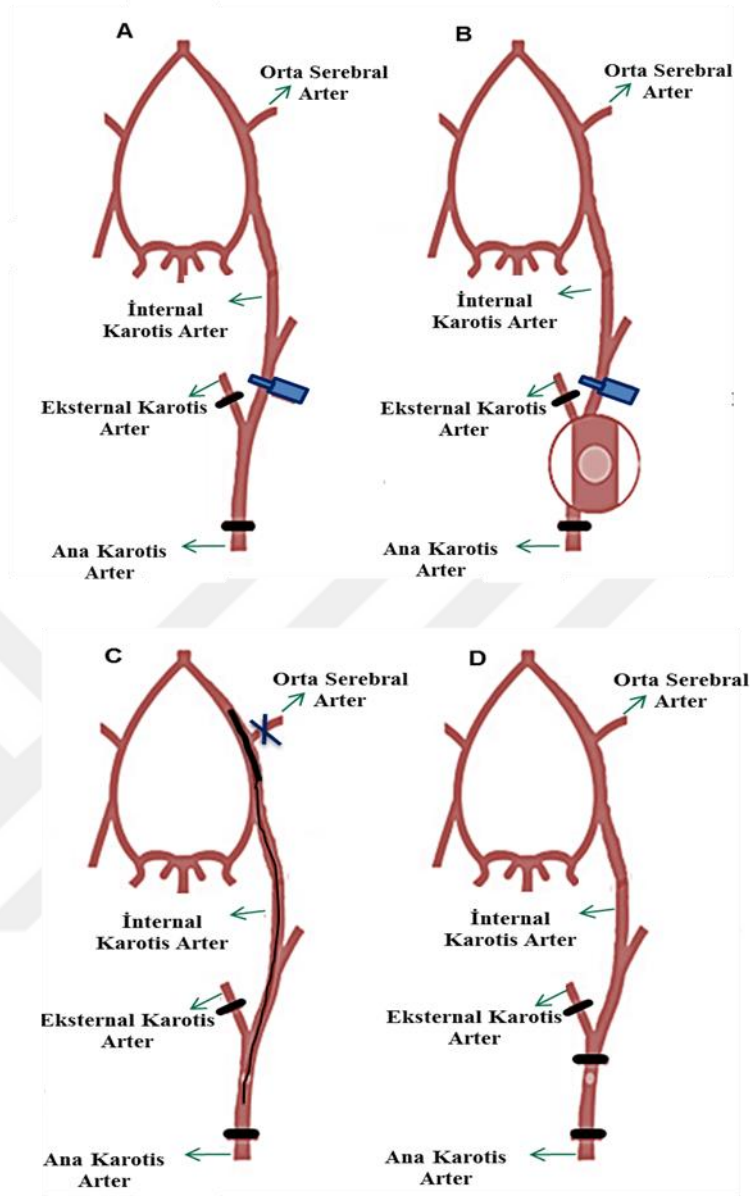
- Grup1: DMSO; 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon
- Grup2: Melatonin; 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon.
- Grup3: Wortmannin; 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon.
- Grup4: Melatonin+ Wortmannin; 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon.



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.

5.2. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli

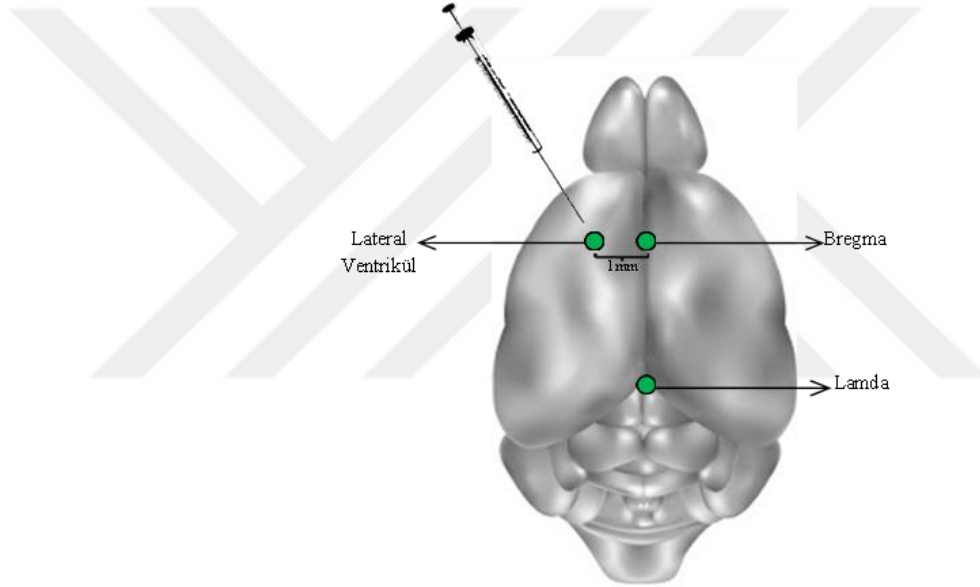
20-25 gram ağırlığında 8-12 haftalık erkek C57BL6/j fareler, %1 İzofluran (%30 O₂, kalanı N₂O) ile gaz anestezide alınmış ve vücut sıcaklıkları 36,5-37,0 °C arasında hemotermik ısıtıcı sistem (Harvard Apparatus) ile sabit tutulmuştur. Beyin felci modelinin tekrar edilebilirliğinin kontrolü amacıyla beyin kan akımı, Laser Doppler Flowmetry cihazı (LDF; Perimed, Stockholm, İsveç) ile beyin felci operasyonları süresince ve reperfüzyon başından itibaren ilk 20 dakika boyunca takip edilmiştir. Laser Doppler Flowmetry cihazının probu, kafatası kemiği üzerine Bregma -2mm, lateral 6mm koordinatlarında olacak şekilde yerleştirilmiş ve LDF kaydı alınmıştır. 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması modeli monofilament yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.2.1). Bu modelde, boyun bölgesine kesi yapılmıştır. Orta ve eksternal karotid arterler izole edilmiş ve 6-0'lık ipek ip (S1165, Doğsan, Türkiye) ile bağlanmıştır. İnternal karotid arter geçici olarak mikrovasküler klips (FE691, Aesculap, Germany) ile tıkanmıştır. Sonrasında, kommon karotid artere küçük bir kesi atılarak ucu 4 mm silikon ile kaplı 11 mm uzunluğundaki 180° çaplı 7-0 monofilament (701934PK5Re, Docol, ABD) kommon karotid artere atılan kesiden internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itilmiştir. Monofilamentin damar içinde itilmesiyle beraber beyin kan akımındaki düşüş Laser Doppler cihazı ile kontrol edilmiştir. 30 dakika sonra 7-0 monofilament ip geri çekilmiş ve reperfüzyona izin verilmiştir (Şekil 5.2.1).



Şekil 5.2.1. Orta serebral arter tıkanması modeli. A) Karotis arterlerin bağlanması, B) Ana karotis artere küçük bir kesi atılması, C) Ucu silikon kaplı monofilamentin arter içinde ilerletilmesi, D) Reperfüzyon.

5.3. Beyin İçi Enjeksiyon

Araştırmada farelere orta serebral arter tıkanması yöntemi uygulanmadan 30 dakika önce beyin içi enjeksiyon yapılmıştır. %1,5 İzofluran (%30 O₂, kalanı N₂O) altında gaz anesteziye alınarak stereotaksik sabitleyiciye (World Precision Instruments, Kanada) yerleştirilen farelere Hamilton iğnesi (Hamilton® Microliter™ 701, Sigma Aldrich, ABD) vasıtasıyla enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Lateral ventriküle (bregma 0, lateral 1 mm) 0,1 mM konsantrasyonda PI3K/Akt sinyal yolağı inhibitörü olan Wortmannin (Sigma W1628) veya Wortmannin'in çözücüsü olan dimetilsülfoksit (DMSO) beyin içi enjeksiyonla uygulanmıştır (şekil 5.3.1).



şekil 5.3.1. Beyin içi enjeksiyon koordinatları.

5.4. İntraperitoneal Enjeksiyon

Farelere reperfüzyondan hemen sonra periton içi taşıyıcı (%0,9 NaCl içerisinde çözölmüş %5 etanol) veya melatonin (%0,9 NaCl içerisinde çözölmüş %5 etanol içerisinde 4 mg/kg dozunda) (M5250, Sigma Aldrich, ABD) enjeksiyonu yapılmıştır.

5.5. Deneyin Sonlandırılması

Beyin felcinden 72 saat sonra farelere yüksek dozda %0,9 NaCl içerisinde çözülmüş %7'lik kloral hidrat (23100, Sigma Aldrich, ABD) verilerek hayvanlar sakrifiye edilmiş ve beyinleri çıkartılmıştır. Histolojik çalışmalar ve protein çalışmaları için beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuştur ve -80°C'de saklanmıştır.

5.6. İmmünofloresan

5.6.1. İmmünofloresan boyamalar için kesit alınması

Kuru buz üzerinde dondurulan beyinlerin striatum seviyesinden kryostat cihazı (CM1950, Leica, Almanya) kullanılarak 18 µm'lik koronal kryostat kesitler pozitif yüklü lamlar (Objekttrager; Isotherm, Almanya) üzerine alınmıştır. Kesit alınan lamlar 20 dakika boyunca 40°C' deki ısıtıcı tabla (Wise Term, Wisd Laboratory Instruments, Almanya) üzerinde tutularak doku kesitleri lamlara sabitlenmiştir. Elde edilen kesitler -80°C de saklanmıştır ve TUNEL, NeuN immünofloresan boyamalar için kullanılmıştır.

5.6.2. DNA fragmentasyonu analizi

DNA fragmentasyonu, *İn-situ* Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) (11684795910, Roche, İsviçre) ile analiz edilmiştir. Kit içerisinde çıkan protokole göre, her bir gruptaki hayvanlardan alınan kesitler -80°C'den çıkartılıp 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) içerisinde hazırlanan %4'lük paraformaldehit (PFA) (158127, Sigma-Aldrich, ABD) ile oda sıcaklığında ve +4 °C' de 10'ar dakika tutularak fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyondan sonra PFA'nın uzaklaştırılması için kesitlere PBS yıkaması yapılmıştır. Kesitler, Triton-X-100 (X100, Sigma Aldrich, ABD) deterjanı ve tri-sodyumsitrat di-hidrat (1.064.481.000, Merck, ABD) içeren solüsyona alınmış ve kaynatılarak membran por geçirgenliği ve antijen geri kazanımı artırılmıştır. Sonrasında PBS yıkaması yapılmıştır. 1 saat boyunca %10 normal keçi serumu (Normal Goat Serum, NGS; G9023, Sigma-Aldrich, ABD) içeren PBS-Triton X solüsyonu ile bloklama işleminden sonra enzimini ve substrattını içeren TUNEL kiti

karışımı ile 37°C'de 70 dk boyunca inkübe edilmiştir. Çekirdek boyaması için 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI; D9542, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Değerlendirme için görüntüleri konfokal mikroskopta (LSM 780, Zeiss, Almanya) alınan kesitlerin iskemik striatum bölgesinden rastgele seçilen 62.500 μm^2 'lik on iki bölgeden çekirdek boyaması (DAPI) ile çakışan TUNEL(+) hücre sayımı yapılmıştır.

5.6.3. Nöronal sağkalım analizi

Nöronal sağkalımın analiz edilebilmesi için striatum seviyesinden alınan koronal kesitlere NeuN immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Bu yöntemde, her bir gruptaki hayvanlardan alınan kesitler -80°C'den çıkartılıp 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) içerisinde hazırlanan %4 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 15 dakika tutularak fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyondan sonra PFA'nın uzaklaştırılması için kesitler PBS ile üç kez 5'er dakika yıkanmıştır. Sonrasında 1 saat boyunca normal keçi serumu içeren PBS-Triton X solüsyonu ile bloklama işleminden sonra kesitler 1:100 oranında seyreltilmiş Anti-NeuN-Cy3 konjuge primer antikor (MAB377C3, MerckMillipore, Almanya) ile gece boyunca +4°C'de 75 rpm'deki karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Çekirdek boyaması için DAPI kullanılmıştır. Kesitlerin analizi için görüntüler konfokal mikroskopta (LSM 780, Zeiss, Almanya) alınmıştır.. İskemik ve iskemik olmayan striatum bölgesinden rastgele seçilen 62.500 μm^2 lik on iki bölgeden çekirdek boyaması ile üst üste denk gelen NeuN(+) hücre sayımı yapılmıştır.

5.7. Protein Çalışmaları ve Western Blot

5.7.1. Protein izolasyonu

İskemik striatum bölgesinden alınan doku örneklerinden aynı gruba ait örnekler birleştirilerek protein izolasyonu yapılmıştır. Dokular, proteaz-fosfataz inhibitör kokteyl karışımı (5178, Cell Signalling, ABD) içeren lizis solüsyonu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5M EDTA) içerisinde homojenizatör cihazı ile manyetik boncuklar (BeadBug™ microtube homogenizer, Benchmark Scientific,

ABD) yardımıyla izole edilmiştir. Homojenizasyondan sonra doku örnekleri 20 dakika buz üstünde inkübe edilip +4°C'de 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılarak proteinlerin doku pelletlerinden ayrışması sağlanmıştır. *In vitro* çalışmalar için Neuro2A hücrelerinden yapılan protein izolasyonunda proteaz-fosfataz inhibitör kokteyl karışımı içeren Pierce™ IP lizis solüsyonu (87788, Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. IP lizis solüsyonu eklenen hücre örnekleri 15 dakika buz üstünde inkübasyonları sırasında her 5 dakika bir vorteks cihazı (541-10000-00, Heidolph, Almanya) ile iyice karıştırılmıştır. +4°C'de 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılarak proteinlerin hücre pelletlerinden ayrışması sağlanmıştır.

5.7.2. Protein konsantrasyon ölçümü

Protein konsantrasyon ölçümleri Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen, Life Technologies Corporation, ABD) ve cihazla beraber kullanılan Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen, Life Technologies Corporation, ABD) ile ölçülmüştür. Qubit protein analiz kiti içerisinde çıkan Qubit tampon solüsyonu ve Qubit solüsyonu 1:200 oranında karıştırılarak Qubit protein solüsyonu hazırlanmıştır. Qubit 3.0 Fluorometer cihazının kalibrasyonu için standart 3 farklı protein kullanılmıştır. Proteinler 1:20 oranında otoklavlanmış distile su ile stoklarından ayrı bir tüpte sulandırmış ve Qubit protein solüsyonu içerisine eklenerek ölçüm yapılmıştır. Stokta buluna toplam protein miktarı µg/µl olarak hesaplanmıştır.

5.7.3. Protein örneklerinin hazırlanması

Örnekler, konsantrasyon ölçümlerine göre her örnekten 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplanmış, 2X Laemmli Buffer (161-0737; Bio-Rad, ABD) ile karıştırılıp hacmin geri kalanı otoklavlanmış distile su ile tamamlanmıştır. Proteinlerin, belirli sayı, şekil ve düzendeki amino asit zincirleri haline gelebilmesi için 95°C'de 5 dakika kaynatılan örnekler daha sonra hemen kırık buz üzerine alınmıştır.

5.7.4. Western blot

Hazırlanan örnekler jel elektroforez sistemi kullanılarak yürütülmüştür. Protein örnekleri, jelin her bir kuyusunda 20 µg/10 µl protein olacak şekilde Any kD™ Mini-PROTEAN jellerine (456-9036, Bio-Rad, ABD) yüklenmiştir. İlk olarak

50 V'ta 5 dakika sonrasında ise 100V'ta yaklaşık 2 saat yürütülerek proteinlerin elektroforez (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad, ABD) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrışması sağlanmıştır. Elektroforez bitiminde, Bio-Rad Transblot Turbo sistemi (1704150 Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, ABD) ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti kullanılarak (170-4272; Bio-Rad, ABD) jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Transfer sonrası membranlar, %0,1 Tween20 (P1379, Sigma, ABD) içeren 50 mM tris tamponlu salin (T1503, Sigma, ABD) (TBS-T) ile hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (Blotto, sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat bloklanarak spesifik olmayan bağlanmalar engellenmeye çalışılmıştır. Bloklama sonrası TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde 1:1000 oranında seyreltilen primer antikolar (β -Aktin, 4970, Cell Signalling, ABD; p-AKT, 4060, Cell Signalling, ABD; BMAL 1 (D217G), 14020, Cell Signalling, ABD; CLOCK (D45B10), 5157, Cell Signalling, ABD; PER I, ab3443, Abcam, ABD; PERII, ab180655, Abcam, ABD) ile gece boyu +4°C'de karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranların primer antikordan uzaklaştırılması için 3 kere 5'er dakika TBS-T yıkaması yapılmıştır. TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde 1:5000 oranında seyreltilen yaban turbu peroksidaz (HRP) konjuge tavşan antijenine karşı keçide üretilmiş sekonder antikor (31460, Thermo Scientific, ABD) membranların üzerine eklenmiş ve 90 dakika oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Sonrasında, membranların sekonder antikordan uzaklaştırılması için 3 kere 5'er dakika TBS-T yıkaması yapılmış ve ECL Western görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad Life Sciences Research, ABD) ile inkübe edilen membranlar Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, ABD) ile görüntülenmiştir.

5.7.5. Stripleme

p-AKT primer antikor ile görüntülemesi yapılan PVDF membranlara strip solüsyonu (1 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS, β -merkaptoetanol, ddH₂O) eklenmiştir. 50°C'de 18 dakika stripleme işlemi yapılarak membrana bağlanan antikolar sökülmüştür. Strip solüsyonunun uzaklaştırılması için 6 kere 5'er dakika yıkanan

membranlar önce yeniden %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat bloklanmış ve daha sonra t-AKT (9272, Cell Signaling, ABD) primer antikoruna ile inkübe edilmiştir.

5.7.6. Western blot değerlendirilmesi

Değerlendirmede tüm proteinler β -Aktin proteinine göre normalize edilmiştir. Neuro2A p-Akt protein bandı Neuro2A t-Akt protein bandına göre normalize edilmiştir. Çıkan protein bantları Image J programında (ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD) sayısal piksel yoğunluk değerine göre analiz edilmiştir.

5.8. Melatonin Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi

Melatonin miktarına göre Bmal 1 proteini anlatımında değişiklik olup olmadığını incelemek amacıyla Neuro2A hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, %10 Fetal Sığır Serumuna (FBS; P30 1985, PAN Biotech, Almanya) ve %1 antibiyotik-antimikotik karışımı (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin; PSA, P08 32100 PAN Biotech, Almanya) ile güçlendirilmiş DMEM GlutaMax-I (21885-025, Gibco, Thermo Scientific, ABD) kültür ortamında ve %5 CO₂ ile 37°C'de inkübatör (Heracell 150i, Thermo) içinde çoğaltılmakta ve her 3 günde bir altkültür yapılmaktadır. Melatonin, %100 etanol çözücü içerisinde çözündürülmüş ve 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM veya 1 mM olmak üzere 4 farklı final konsantrasyona ulaşacak şekilde hücrelere uygulanmış ve hücreler 24 saat boyunca 37°C'de inkübatör içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler soğuk dPBS (P04-35500 PAN Biotech, Almanya) içerisinde toplanmış, çöktürülmüş ve elde edilen hücre pelletinden total proteinler yukarıda anlatılan protein izolasyonu yöntemine (5.7.1. Protein izolasyonu) göre izole edilmiştir.

5.9. Oksijen – Glikoz Deprivasyonu (OGD)

In vitro beyin felci modeli olan oksijen – glikoz deprivasyonu (OGD) Neuro2A nöroblastoma hücrelerine uygulanmıştır. 6'lı hücre kültürü petrilere (3516, Corning, ABD) her kuyucukta 200.000 hücre olacak şekilde Neuro2A hücre ekimi yapılmıştır. OGD için Hanks' Balanced tuz solüsyonu (HBSS) (H6648, Sigma Aldrich, ABD) ve hipoksi inkübatörü ile beraber özel gaz karışımı (%5 CO₂, %1 O₂, N₂ balans, HABAŞ 430508) kullanılmıştır. Hücreler 18 saat boyunca OGD maruz

bırakılmıştır. 18. saatin sonunda HBSS solüsyonu, DMEM GlutaMAX™ besi yeri ile değiştirilerek 6 saat boyunca hücrelerin reperfüzyonu için %5 CO₂ %21 O₂ içeren normal inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Scientific, ABD) inkübasyonuna izin verilmiştir. Hücrelerin OGD ve sonrası işaretlenen rastgele 5 farklı bölgeden mikroskopta görüntü alınmış ve hücre sayımı yapılmıştır.

5.10. Bmal 1 Protein İfadesinin Artırılması

Bmal 1 proteininin ifadesinin artırılması için gen klonlama yöntemi uygulanmıştır. Fare Bmal 1 geni mRNA nükleotid dizisi (Mus musculus aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl), transcript variant 1, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_007489.4) belirlenerek bu nükleotid dizisini çoğaltacak uygun primerler dizayn edilmiştir (Tablo 5.10). Bmal 1 geni iProof™ High-Fidelity PZR Kit (172-5330, Biorad, ABD) ve termal döngü cihazı (T100™ Thermal Cycler, Biorad, ABD) kullanılarak çoğaltılmıştır (Tablo 5.10.2). Polimeraz Zincir Reaksiyonun (PZR) doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığı PZR ürünün %0,8'lik agaroz jel içerisinde elektroforez yöntemi ile yürütülmesiyle kontrol edilmiştir. Çoğaltılan Bmal 1 geni ve p-AcGFP1-N1 vektörü (632469, Clontech, ABD) SallI ve BamHI restriksiyon endonükleazları ile kesilerek vektör ile gen ligasyon işlemi ile birleştirilmiştir. Bmal 1 ile ligasyon yapılan vektör plazmid transformasyonla kompetent *E.coli* Stbl3 bakterisi içine verilmiş ve bu bakteriler kanamisin antibiyotiği (P06-14100, PanBiotech, Almanya) içeren Luria Bertani Broth (LB) agar (A8523, Biomatik, Kanada) besi yerinde 16-18 saat 37°C'de çoğaltılmıştır. Transformasyon sonrası, plazmidin Bmal 1 genini doğru bir şekilde içine alıp almadığı restriksiyon enzimleriyle kesilip %0,8'lik agaroz jel içerisinde elektroforezle kontrol edilmiştir. Sonrasında Bmal 1 plazmidini içine alan *E.coli* Stbl3 bakteri kolonilerinden rastgele bir tanesi seçilerek Luria Bertani Broth (LB) sıvı besi yeri (A8521, Biomatik, Kanada) içerisinde çoğaltılmıştır. ZymoPURE™ Plasmid Midiprep kiti (D4200&D4201, Zymo Research, ABD) kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmış ve izole edilen Bmal 1 plazmidleri transfeksiyon ile Neuro2A hücrelerine verilerek Bmal 1 proteininin ifadesi arttırılmıştır.

Tablo 5.10.1. Bmal 1 PZR Primeleri Dizaynı.

Bmal 1 PZR Primerleri

Primer Forward (P _F)	5'-AgTCA gTC gAC A ATg gCg gAC CAg AgA ATg g -3' SalI
Primer Reverse (P _R)	5'-AgTCA ggA TCC AA CAg Cgg CCA Tgg CAA gT -3' BamHI

Tablo 5.10.2. Bmal 1 geni için oluşturulan PCR basamakları

PZR Basamakları

Sıcaklık	Süre
98°C	60 sn
98°C	10 sn
66 °C	30 sn
72°C	90sn
72°C	300 sn
4°C	∞

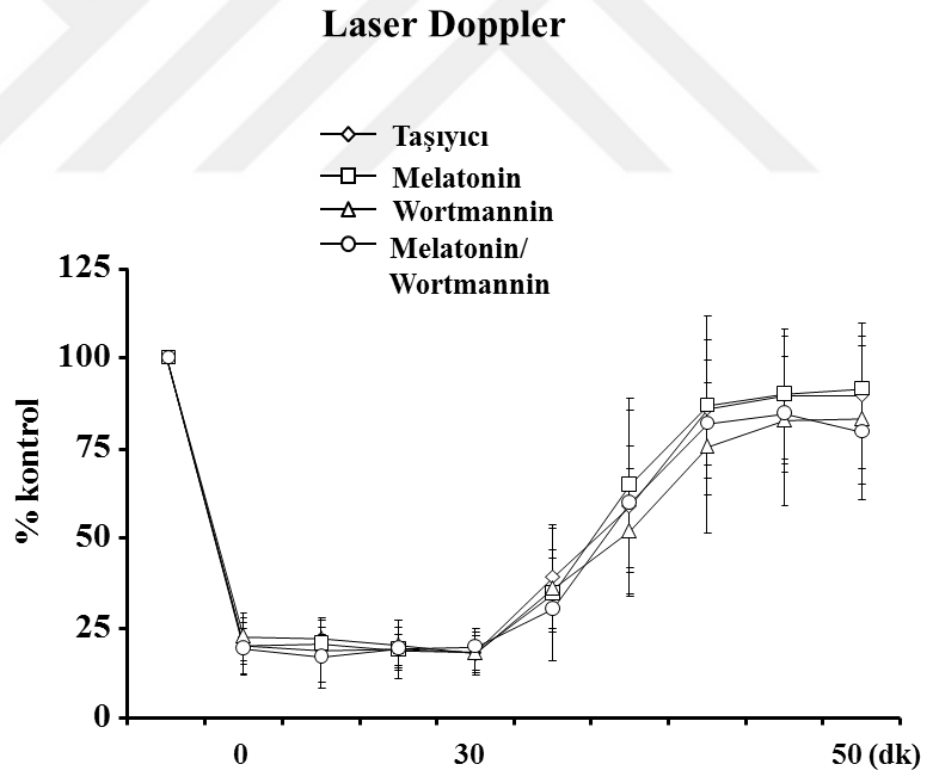
5.11.İstatistik

Deney grupları arasındaki zamana bağlı değişimler tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Fisher LSD post-hoc testi ya da bağımsız örneklem t-testi kullanılarak SPSS programında yapılmıştır. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Beyin Kan Akımının Ölçülmesi

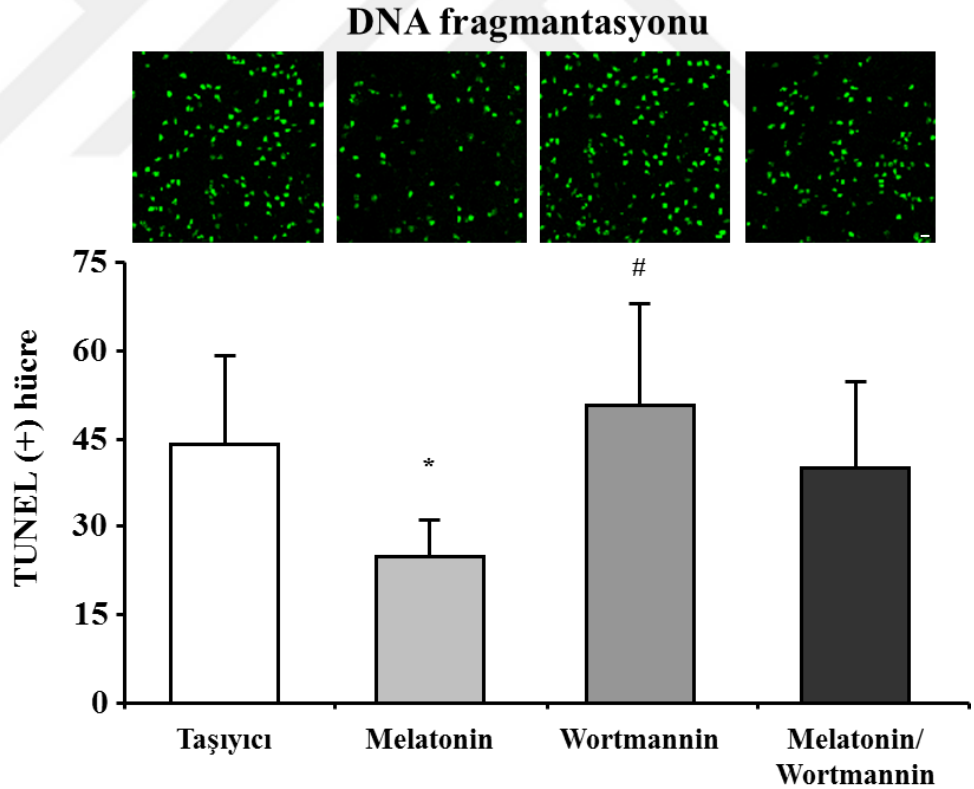
Deneysel beyin felci modelinin tekrar edilebilirliğinin kontrolü amacıyla beyin kan akımı Laser Doppler flowmetry (LDF) cihazı ile beyin felci operasyonları süresince ve reperfüzyon başlangıcından itibaren takip edilmiştir. Laser Doppler kan akımı ölçümleri orta serebral arterin beslediği striatum bölgesinden alınmıştır. 30 dakikalık beyin felci operasyonları ve reperfüzyon boyunca taşıyıcı (DMSO), melatonin, Wortmannin veya melatonin/Wortmannin grupları arasında beyin kan akımında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. Tüm grupların LDF düzeyleri, beyin felci öncesi alınan değerlere göre yaklaşık %80'lik bir azalma ile sonuçlanmıştır. Reperfüzyona izin verilmesi ile beyin kan akımının hızla arttığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1.1. Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler kan akım (LDF) kaydı.

6.2. DNA Fragmantasyonu ile Apoptotik Hücre Analizi

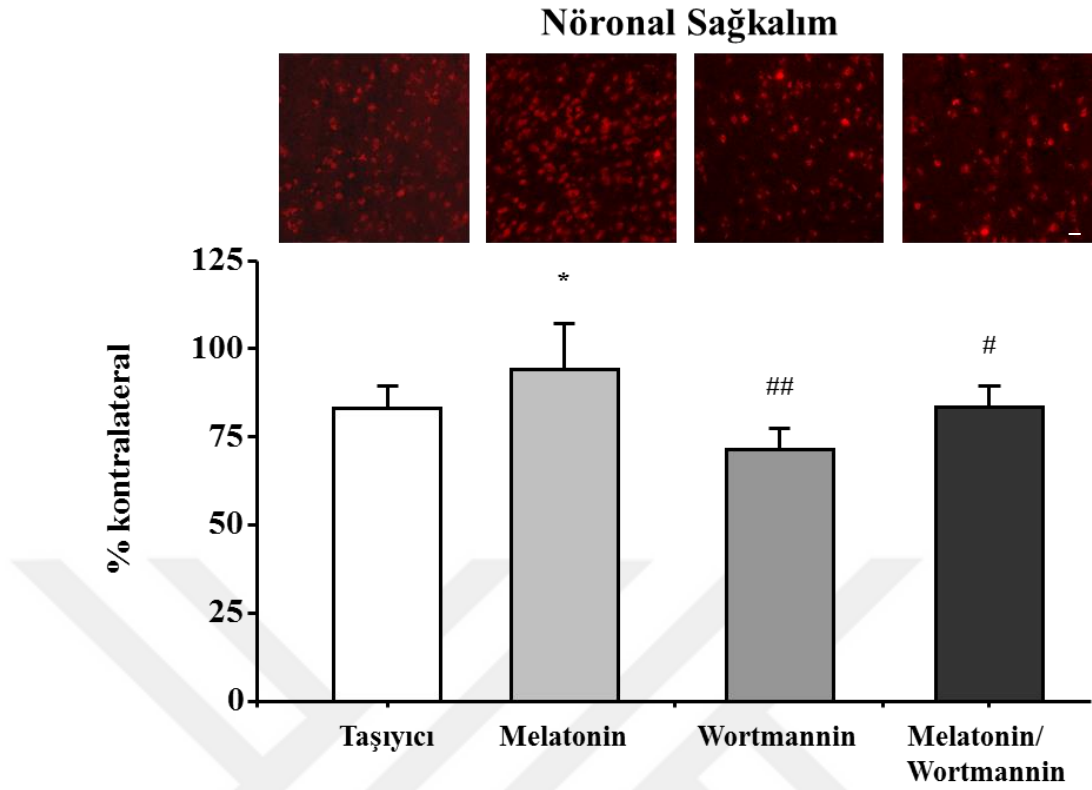
Beyin felci sonrasında Bmal 1 ve melatonin ilişkisinin değerlendirilmesi için DNA fragmantasyonu ile apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir. 30 dakika beyin felci geçiren farelerin striatum seviyesinden alınan kesitlere terminal deoksinüleotidil transferaz dUTP uç etiketleme (TUNEL) boyaması yapılmıştır. Boyama sonrasında kesitler konfokal mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir. Striatum bölgesinden her biri 62.500 μm^2 olan rastgele on iki bölgeden TUNEL (+) hücre sayımı yapılmış ve bu bölgelerin ortalaması alınmıştır. Apoptotik hücre sayısı taşıyıcı gruba göre melatonin tedavisi ile beraber istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Melatonin $p=0,49$). Hücresel sağkalım sinyal yolağı PI3K/Akt baskılayıcısı Wortmannin, melatonin tedavisine göre apoptotik hücre sayısını anlamlı seviyede arttırmıştır (Wortmannin $p=0,012$). Melatonin/Wortmannin grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 6.2.1).



Şekil 6.2.1. Apoptotik hücre analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p<0,05$ ile taşıyıcı grubuna göre, # $p<0,05$ ile melatonin grubuna göre istatistiksel anlamlılığı gösterilmiştir (Bar=100 μm).

6.3. Nöranal Sağkalımın Değerlendirilmesi

30 dakika beyin felci ardından 72 saat reperfüzyondan sonra deney sonlandırılarak striatum bölgesinden $18 \mu\text{m}^2$ kalınlığında kesitler alınmış ve NeuN immüno Floresan boyaması ile nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Çekirdek boyaması için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama sonrasında kesitler konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Hem kontralateral hem de ipsilateral striatum bölgesinden her biri $62.500 \mu\text{m}^2$ olan rastgele on ikişer bölgeden DAPI çekirdek boyaması ile çakışan NeuN (+) hücrelerin sayımı yapılmıştır ve gruplarda ortalama olarak bulunan NeuN (+) hücre sayısı kontralateral striatum bölgesine oranlanarak olarak verilmiştir. Beyin felci sonrası melatonin tedavisinin nöronal sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Melatonin grubunda taşıyıcı grubuna göre nöronal sağkalımda istatistiksel olarak artış gözlemlenmiştir (melatonin $p=0,021$). Ayrıca, nöranal sağkalımda görevli olan fosfotidilinositol 3-kinaz sinyal yolağı inhibitörü olan Wortmannin ve melatonin/ Wortmannin grubunda ise melatonin tedavisine göre nöronal sağkalımın istatistiksel olarak azaldığı bulunmuştur (Wortmannin $p=0,000$; Melatonin/Wortmannin $p=0,23$; Şekil 6.3.1).



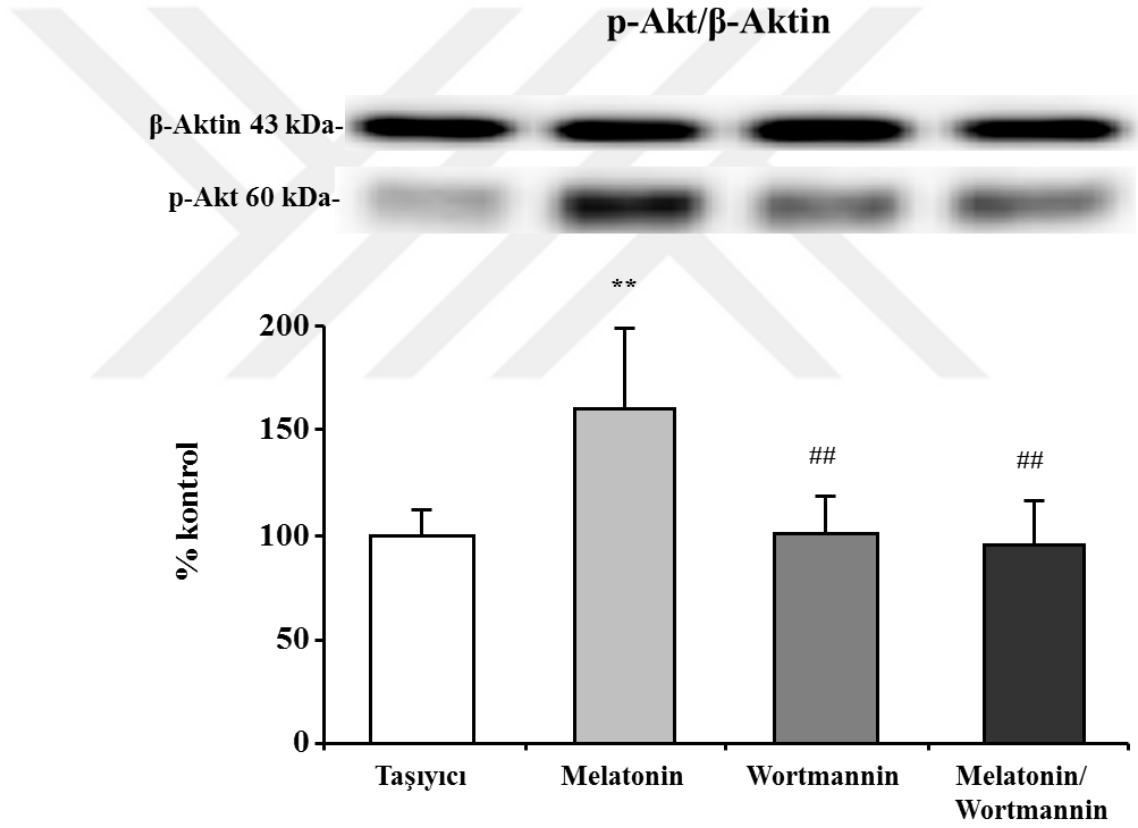
Şekil 6.3.1. Nöronal sağkalım analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ ile taşıyıcı grubuna göre, ## $p < 0,01$ / # $p < 0,05$ ile melatonin grubuna göre istatistiksel anlamlılığı gösterilmiştir (Bar=100 μ m).

6.4. Western Blot ile Protein Analizleri

Beyin felci sonrası melatonin ve Bmal 1 proteininin ilişkisinin araştırılması için 30 dakika beyin felci takiben 72 saat reperfüzyon yapılan farelerin ipsilateral striatum seviyesinden alınan doku örneklerine Western Blot tekniği kullanılarak protein analizleri yapılmıştır. Sirkadyen ritim proteinlerinden olan Clock, Bmal 1, Per-I, Per-II proteinlerinin seviyelerindeki değişimler, melatonin ve nöronal sağkalım ile ilişkili olduğu bilinen Akt proteini düzeyindeki değişimler değerlendirilmiştir. Proteinler, β -Actin proteinine göre normalize edilmiştir. Protein düzeyindeki değişimler taşıyıcı grubuna göre oranlanarak verilmiştir.

6.4.1. Western blot ile p-Akt proteini analizi

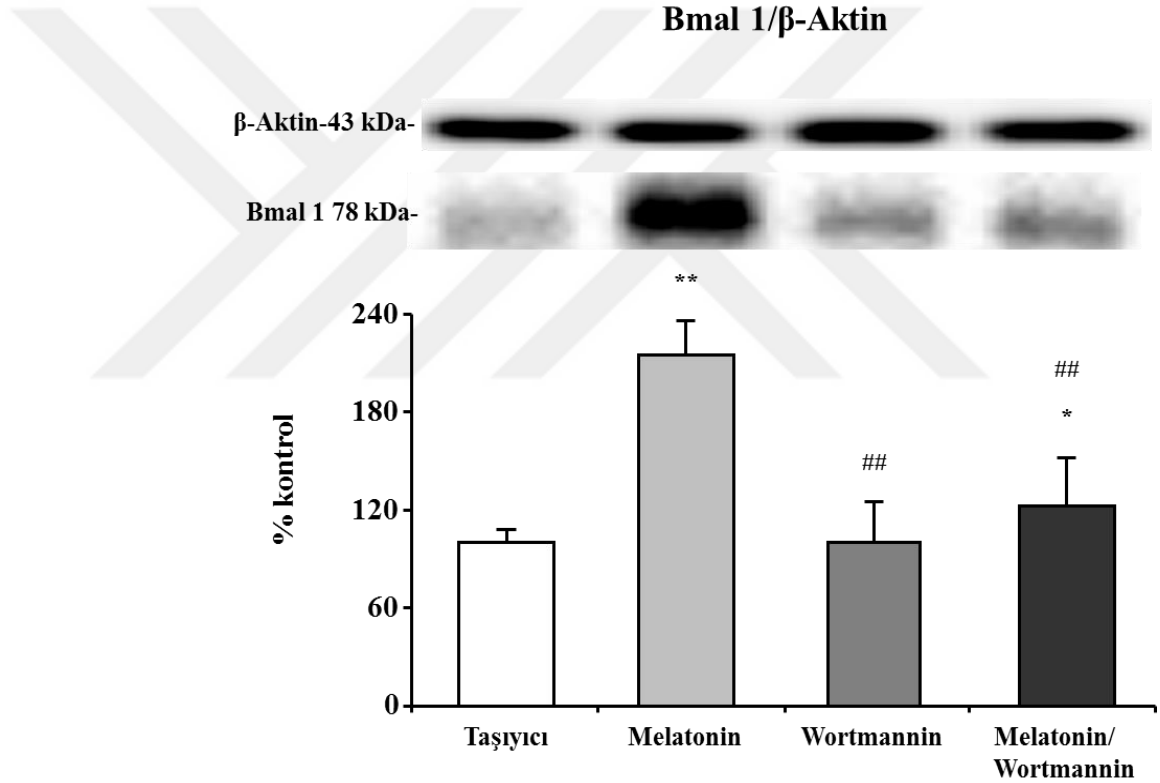
Beyin felci sonrası melatonin ve Bmal 1 proteinin ilişkilendirilmesinde fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücre sinyal yolağı tarafından fosforlandığı bilinen p-Akt protein seviyesine bakılmıştır. Melatonin tedavisi ile beraber p-Akt protein seviyesinde taşıyıcı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış gözlemlenmiştir (melatonin $p=0,000$). Wortmannin ve melatonin/Wortmannin grubu p-Akt protein seviyesinde melatonin tedavisine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Wortmannin $p=0,000$; Melatonin/Wortmannin $p=0,000$; Şekil 6.4.1.1).



Şekil 6.4.1.1. p-Akt protein seviyesi analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0,01$ / taşıyıcı grubuna göre, ## $p<0,01$ /melatonin grubuna göre, istatistiksel anlamlılığı gösterilmiştir.

6.4.2. Western blot ile Bmal 1 proteini analizi

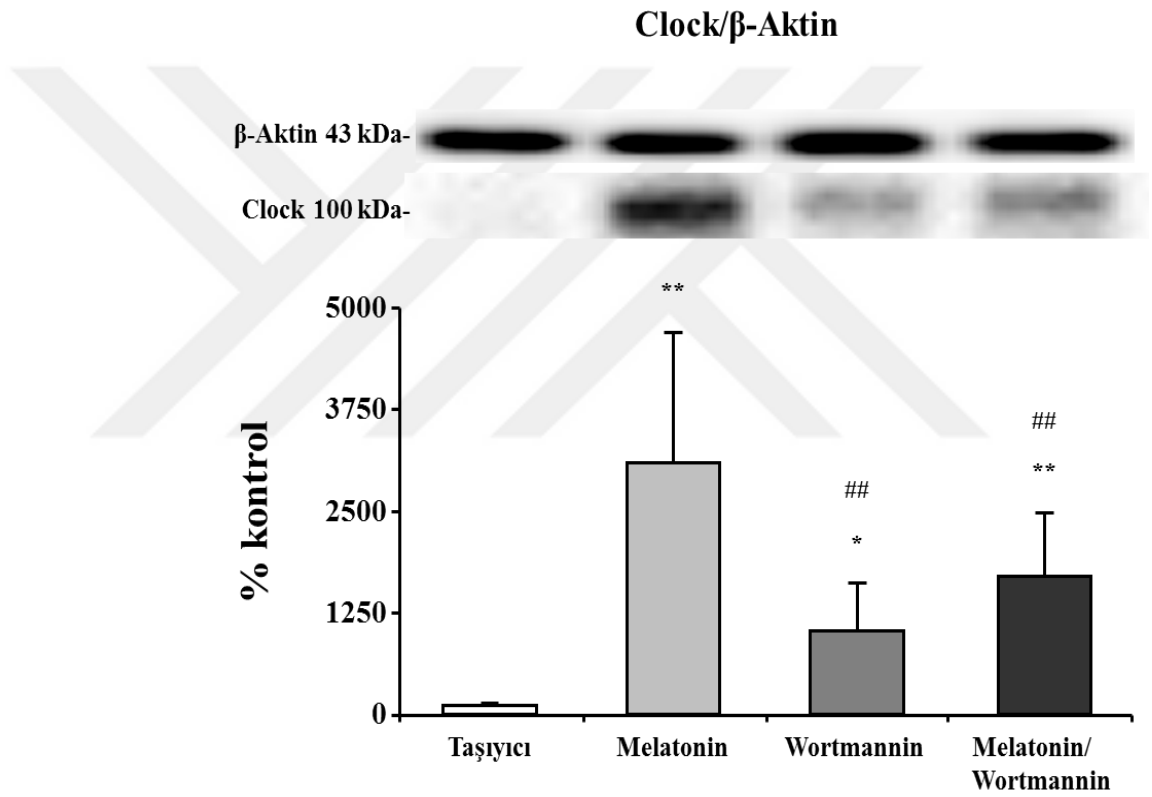
Sirkadyen ritim proteinlerinden olan Bmal 1 protein seviyesi melatonin tedavisi ile beraber taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (melatonin $p=0,000$). Ayrıca Melatonin/Wortmannin grubunda da taşıyıcı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Bmal 1 protein seviyesinde artış görülmüştür (Melatonin/Wortmannin $p=0,46$). Bunların yanında Wortmannin ve melatonin/ Wortmannin grubunda Bmal 1 protein seviyesinde melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı anlamlı bir düşüş görülmüştür (Wortmanin $p=0,000$; Melatonin/Wortmannin $p=0,000$; Şekil 6.4.2.1).



Şekil 6.4.2.1. Bmal 1 protein seviyesi analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0.01$ taşıyıcı grubuna göre, ## $p<0.01$ melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.4.3. Western blot ile Clock proteini analizi

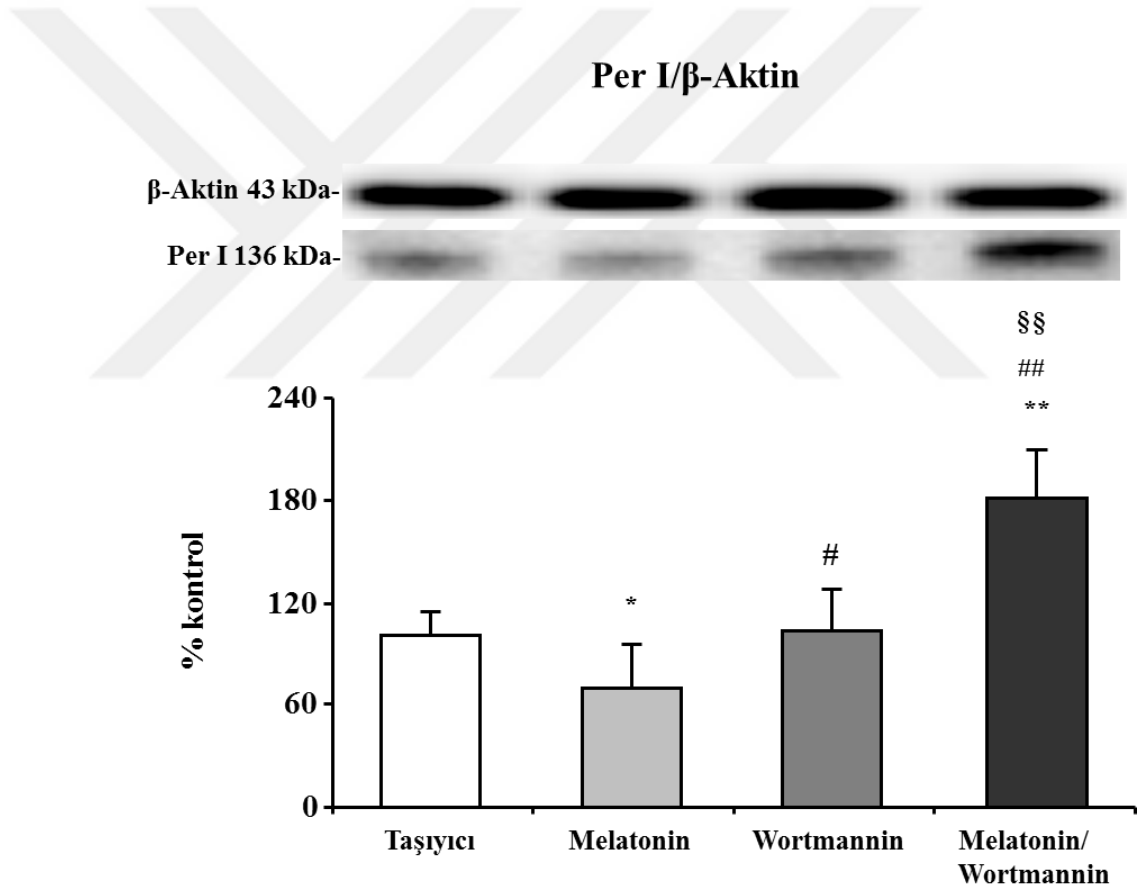
Clock protein seviyesi analiz edildiğinde melatonin, Wortmannin, melatonin/Wortmannin gruplarının her birinde taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur (Melatonin $p=0,000$; Wortmannin $p=0,43$; Melatonin/Wortmannin $p=0,001$). Wortmannin ve melatonin/Wortmannin grubu melatonin grubu ile kıyaslandığında Clock protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Wortmannin $p=0,000$; Melatonin/Wortmannin $p=0,004$; Şekil 6.4.3.1).



Şekil 6.4.3.1. Clock protein seviyesi analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0,01$ / * $p<0,05$ taşıyıcı grubuna göre, ## $p<0,01$ melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.4.4. Western blot ile Per-I proteini analizi

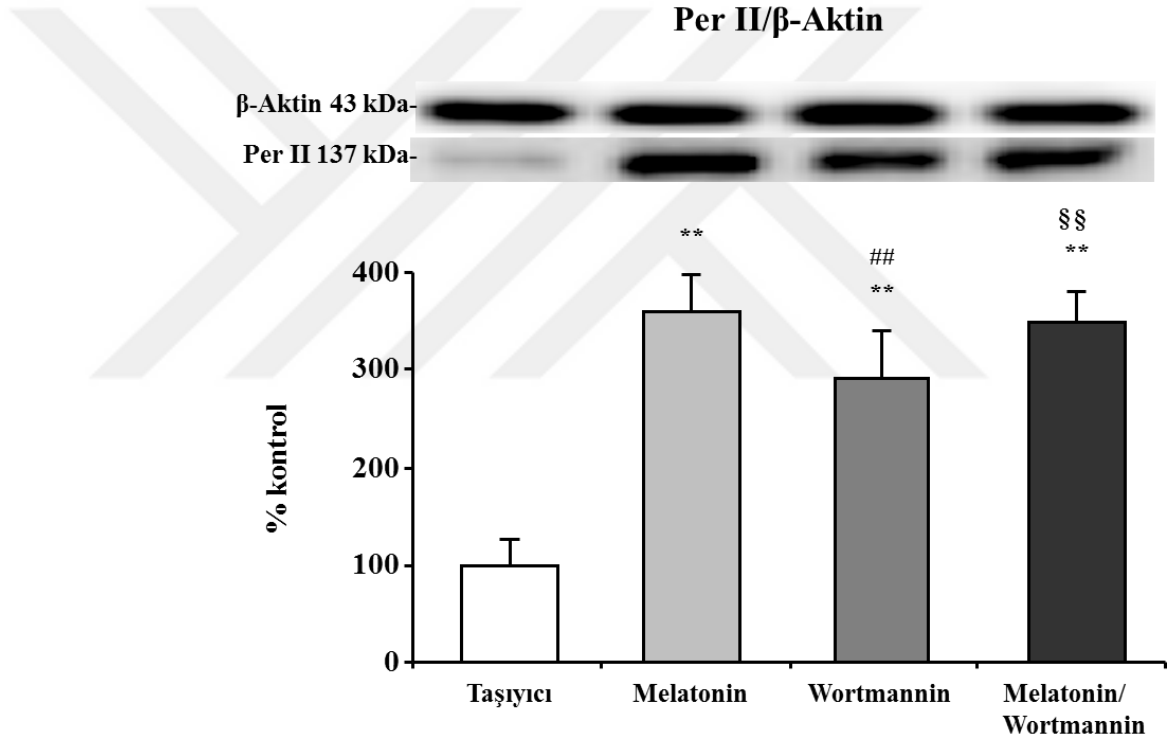
Melatonin ile birlikte Per-I protein seviyesinde taşıyıcı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gözlemlenmiştir (Melatonin $p=0,35$). Fakat melatonin/ Wortmannin ile birlikte Per-I proteininde taşıyıcı gruba göre istatistiksel bir artış olduğu bulunmuştur (Melatonin/Wortmannin $p=0,000$). Wortmannin ve melatonin / Wortmannin grubu Per-I protein seviyesinde melatonin grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır (Wortmannin $p=0,20$; Melatonin/Wortmannin $p=0,000$). Melatonin/ Wortmannin grubunda ise Wortmannin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış olduğu belirlenmiştir (Melatonin/Wortmannin $p=0,000$; Şekil 6.4.4.1).



Şekil 6.4.4.1. Per-I protein seviyesi analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p<0.05$ taşıyıcı grubuna göre, §§ $p<0.01$, # $p<0.05$ melatonin grubuna göre, §§ $p<0.01$ Wortmannin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.4.5. Western blot ile Per-II proteini analizi

Melatonin ile beraber Per-II protein seviyesinde taşıyıcı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış gözlemlenmiştir (Melatonin $p=0,000$). Bununla birlikte Wortmannin ve melatonin/Wortmannin grubunda da taşıyıcı gruba göre Per-II proteininde istatistiksel olarak artmıştır (Wortmannin $p=0,000$; melatonin/Wortmannin $p=0,000$). Per-II protein seviyesinde, Wortmannin grubunda melatonin grubuna göre istatistiksel bir azalma görülürken melatonin / Wortmannin grubunda Wortmannin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (Wortmannin $p=0,000$; melatonin/Wortmannin $p=0,002$; Şekil 6.4.5.1).

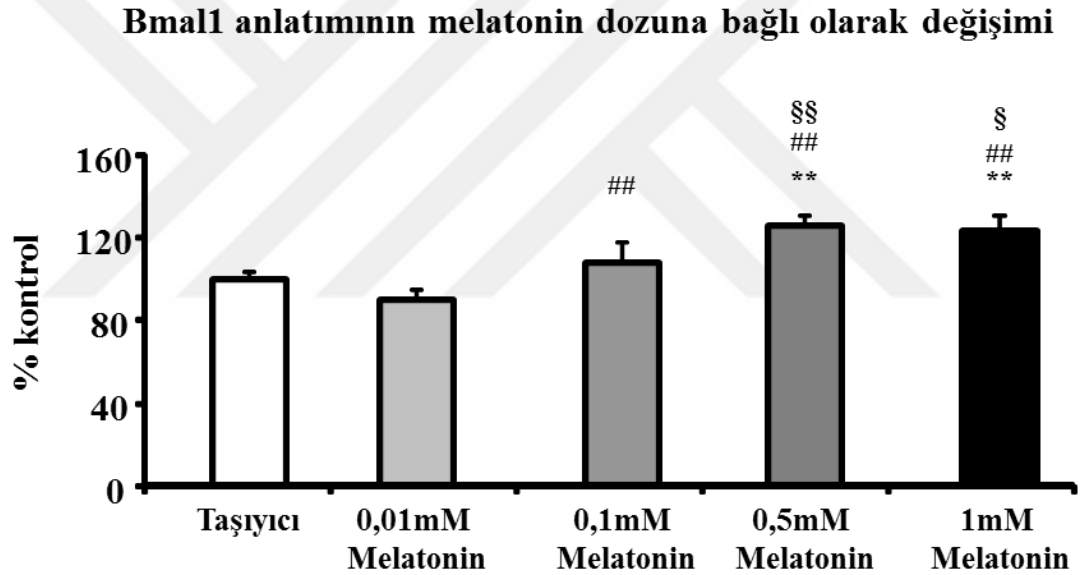


Şekil 6.4.5.1. Per-II protein seviyesi analizi Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0.01$ taşıyıcı grubuna göre, ## $p<0.01$, melatonin grubuna göre, §§ $p<0.01$ Wortmannin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.5. Bmal 1 Proteinin Melatonin İle Değişiminin Değerlendirilmesi

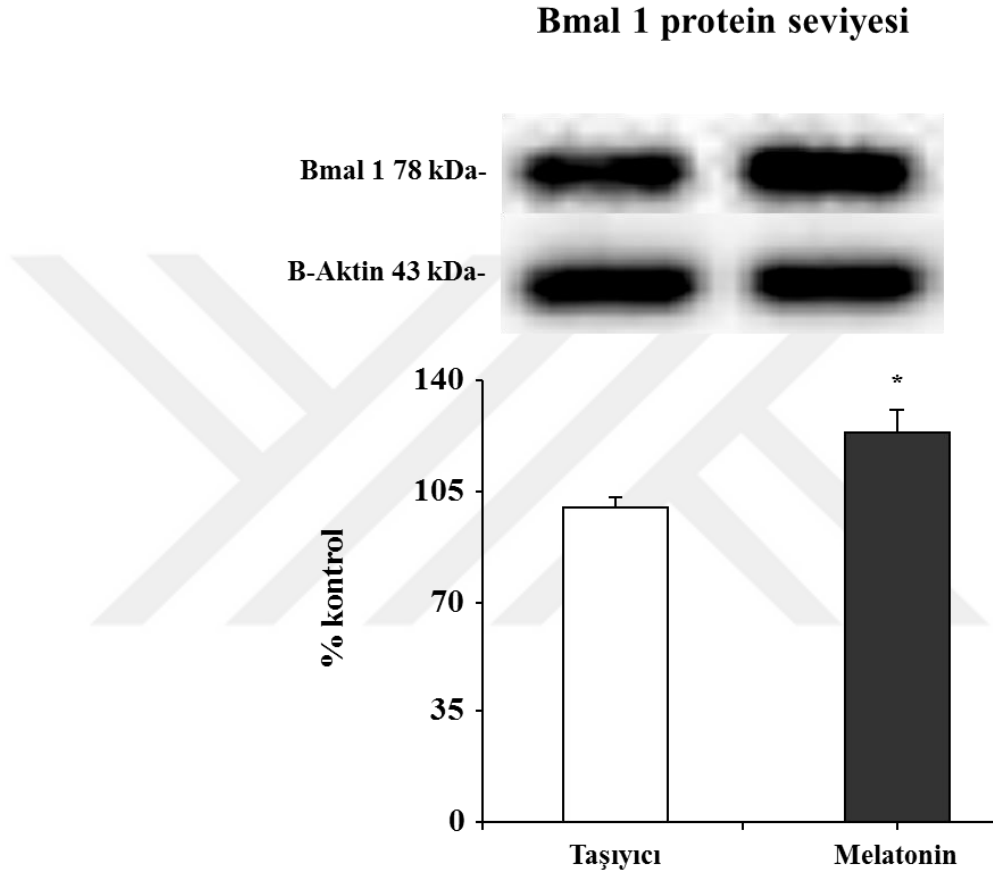
In vitro çalışmalarda Neuro2A hücre hattı kullanılarak melatoninin normal koşullar altında Bmal 1 proteini üzerine olan etkileri Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme bağımsız örneklem t-testi ($p<0,05$)

kullanılarak yapılmıştır. Bmal 1 anlatımına bağlı melatonin dozunun belirlenmesi için Neuro2A hücrelerine farklı dozlarda melatonin tedavisi uygulanmış ve Bmal 1 seviyesine bakılarak uygun melatonin konsantrasyonu belirlenmiştir. 0,5 mM melatonin ve 1 mM melatonin tedavisinde taşıyıcı gruba göre istatistiksel anlamlılık görülmüştür (0,5 mM melatonin $p=0,000$; 1 mM melatonin $p=0,001$). 0,1 mM melatonin, 0,5 mM melatonin ve 1 mM melatonin grubunda 0,01 mM melatonin grubuna göre Bmal 1 protein ifadesinde istatistiksel olarak artış görülmüştür (0,1 mM melatonin $p=0,007$; 0,5 mM melatonin $p=0,000$ ve 1 mM melatonin $p=0,000$). 0,5 mM melatonin ve 1 mM melatonin grubu 0,1 mM melatonin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (0,5 mM melatonin $p=0,004$; 1 mM melatonin $p=0,012$; Şekil 6.5.1).



Şekil 6.5.1. Melatonin doz uygulanmasından sonra Bmal 1 protein ifadesindeki değişim. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0,01$, * $p<0,05$ taşıyıcı grubuna göre, ## $p<0,01$ 0,01 mM melatonin grubuna göre, §§ $p<0,01$, § $p<0,05$ 0,1 mM melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Neuro2A hücre hattına 0,5 mM konsantrasyonda melatonin uygulanarak taşıyıcı gruba göre Bmal 1 protein seviyesi değerlendirilmiştir ve Bmal 1 protein seviyesinde 0,5 mM konsantrasyon melatoninle beraber istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bulunmuştur (Bmal 1 p=0,014). Bmal 1 proteini, β -Actin proteinine göre normalize edilmiştir (Şekil 6.5.2).



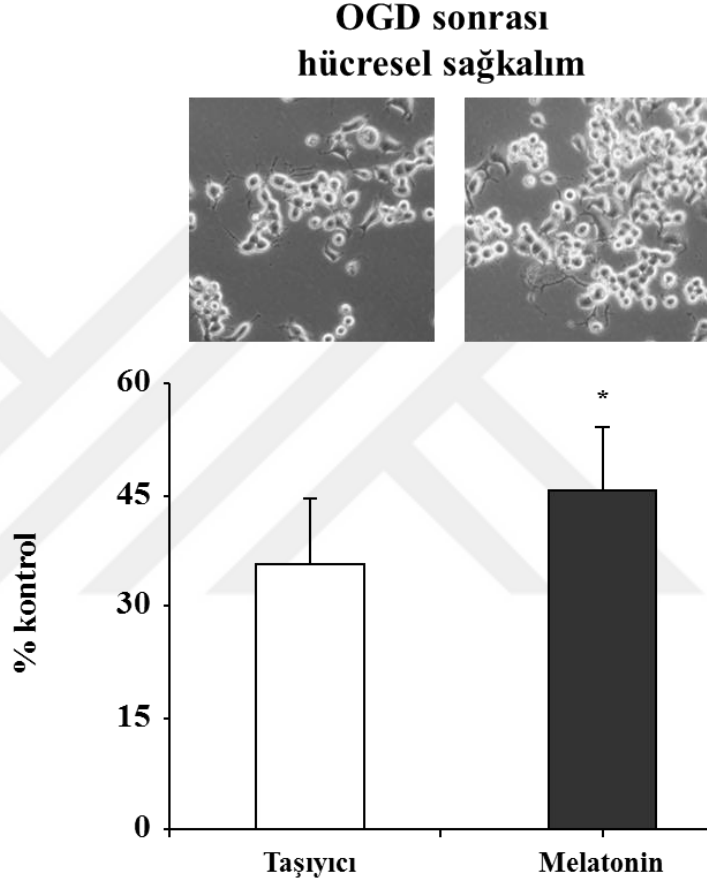
Şekil 6.5.2: Melatonin uygulanmasından sonra Bmal 1 protein ifadesindeki değişim. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * p<0.05 taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.6. OGD'nin Bmal 1 Proteini Üzerine Olan Etkileri

In vitro çalışmalarda Oksijen-Glikoz deprivasyonuna (OGD) (18 saat OGD takiben 6 saat reperfüzyon) tabi tutulan Neuro2A hücre hattına 0,5 mM konsantrasyonda melatoninin uygulanmıştır ve sonrasında Bmal 1 proteini üzerine olan etkileri Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme bağımsız örneklem t-testi (p<0,05) kullanılarak yapılmıştır.

6.6.1. OGD sonrası hücresel sağkalıma etkisi

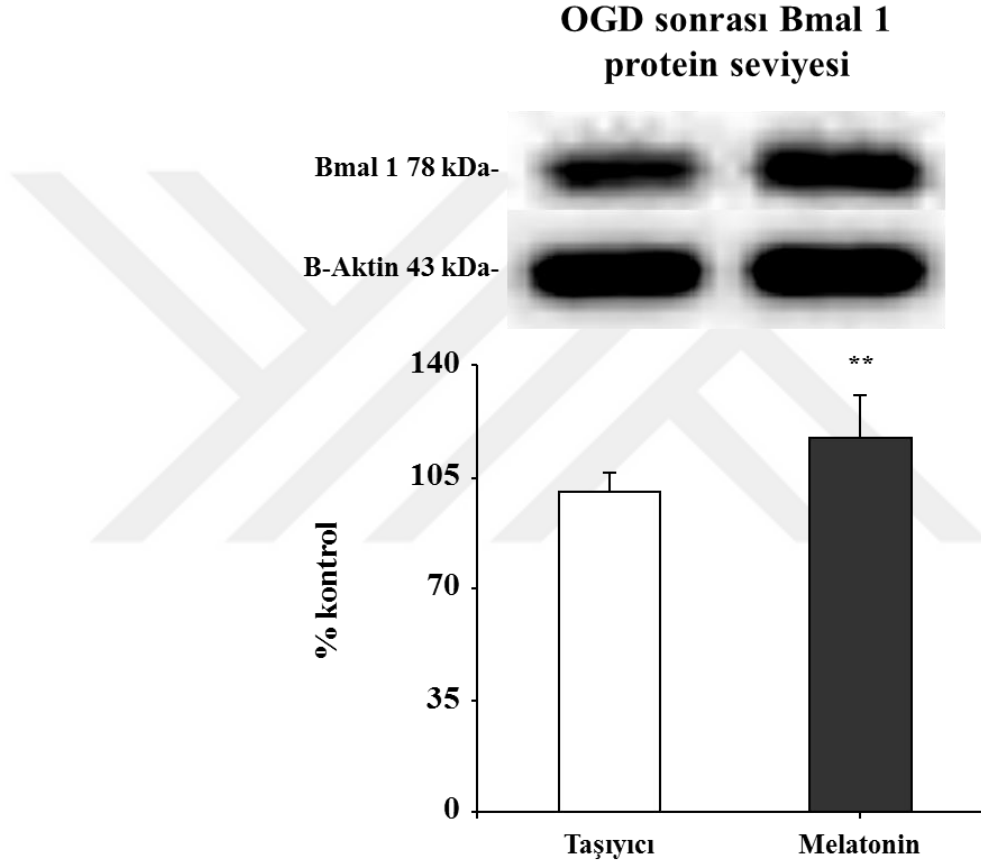
18 saat OGD sonrası 6 saat reperfüzyon sonunda 0,5 mM melatonin uygulanmış olan Neuro2A hücrelerinde hücresel sağkalım melatonin grubunda taşıyıcı gruba göre istatistiksel olarak daha fazladır (Melatonin $p=0,018$; Şekil 6.6.1.1)



Şekil 6.6.1.1. Melatoninle beraber OGD sonra hücresel sağkalım analizi Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p<0.05$ taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.6.2. OGD sonrası Bmal 1 protein seviyesinin western blot ile değerlendirilmesi

Neuro2A hücrelerine OGD işlemi uygulandıktan sonra Western Blot yöntemi ile Bmal 1 proteinin seviyesi değerlendirilmiştir. OGD sonrası Bmal 1 protein seviyesinin melatonin grubunda taşıyıcı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bmal 1 proteini, β -Aktin proteinine göre normalize edilmiştir (Melatonin $p= 0,004$; Şekil 6.6.2.1).



Şekil 6.6.2.1. Melatoninle beraber OGD sonra Bmal 1 protein seviyesi analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0.01$ taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

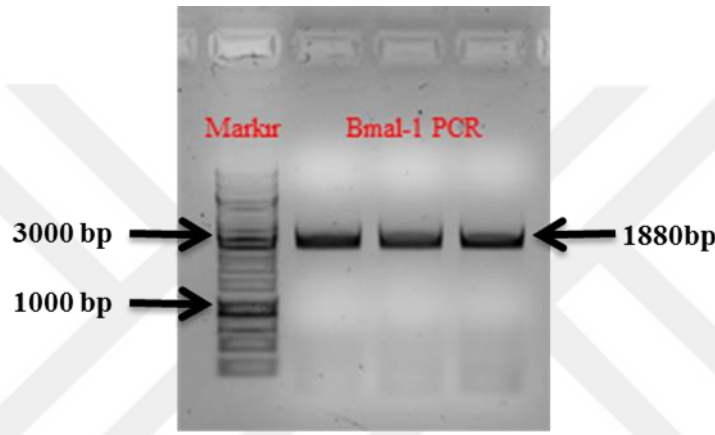
6.7. Bmal 1 Protein İfadesinin Artırılması ve OGD Sonrası Etkilerinin Değerlendirilmesi

Bmal 1 protein ifadesinin artırılması için Bmal 1 proteini GFP içeren plazmid vektörüne klonlanmıştır. Boş plazmid vektörü ve Bmal 1 vektörü Neuro2A hücrelerine verildikten 72 saat sonra hücrelerden protein izole edilip Bmal 1 protein seviyesine bakılmıştır. Ayrıca Bmal 1 protein klonlamasının doğru bir şekilde yapıldığı yapıldığı agaroz gel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme bağımsız örneklem t-testi kullanılarak yapılmıştır. ** $p < 0,01$ / * $p < 0,05$ ile taşıyıcı veya GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı gösterilmiştir.



6.7.1. Bmal 1 protein klonlamasının kontrolü

Bmal 1 protein klonlamasının doğru bir şekilde yapılıp yapılmadığını anlamak için önce tüm mRNA dizisinden primerler vasıtasıyla çoğaltılan Bmal 1 genin doğru bir şekilde çoğalıp çoğalmadığı agaroz gel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Agaroz gel elektroforezi ile istenilen bant elde edilmiştir (Şekil 6.7.1.1). Ardından GFP vektörüne klonlanan Bmal 1 genin vektör içine doğru bir şekilde girip girmediği restriksiyon enzimleri kesimi sonrası agaroz gel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 6.7.1.2).



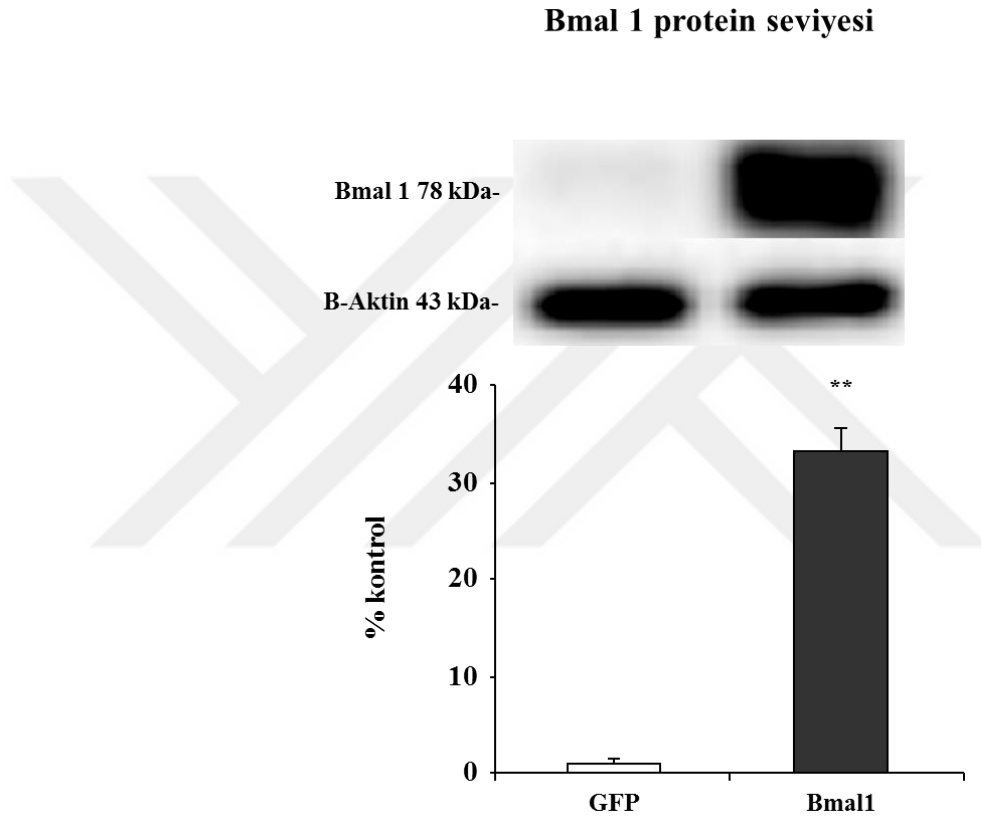
Şekil 6.7.1.1. Bmal 1 geninin PCR ile çoğaltımının kontrolü



Şekil 6.7.1.2. İfadesi arttırılmış Bmal 1'in restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek agaroz jelde kontrol edilmesi.

6.7.2. Bmal 1 protein ifadesinin artırılması

GFP içeren plazmid vektörüne klonlanarak elde edilen Bmal 1 vektörü ve boş GFP plazmid vektörü Neuro2A hücrelerine verilmiştir. 72. saatin sonunda protein izolasyonu yapılarak Bmal 1 protein seviyesine bakıldığında klonlamanın başarılı bir şekilde yapıldığı ve Bmal 1 seviyesini kontrol grubuna göre yaklaşık 35 kat arttırdığı gözlemlenmiştir (Bmal 1 $p=0,002$; Şekil 6.7.2.1).

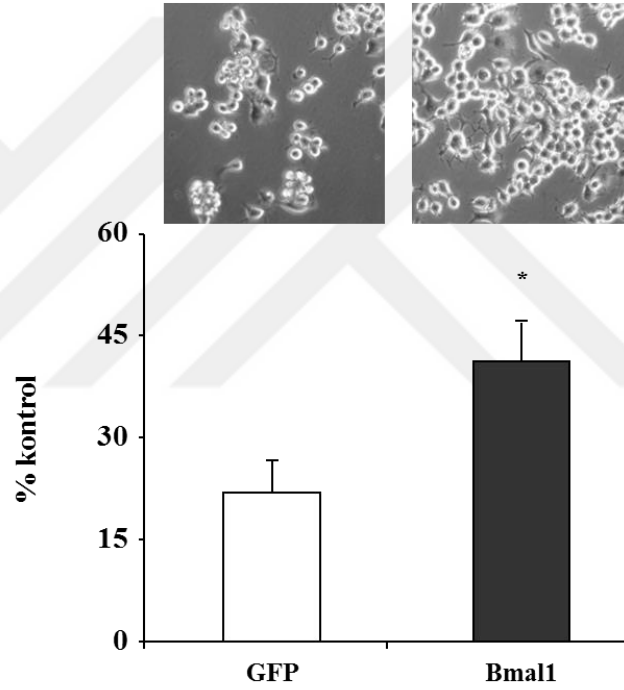


Şekil 6.7.2.1. Bmal 1 protein ifadesinin artırılması ile protein seviyesinde meydana gelen değişim. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0.01$ GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.7.3. Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerin OGD sonrası hücresel sağkalıma etkisinin değerlendirilmesi

Bmal -1 protein ifadesi arttırılmış olan Neuro2A hücrelerine 18 saat OGD takiben 6 saat reperfüzyon uygulandığında; Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerde, hücresel sağkalım kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Bmal 1 p=0,011; Şekil 6.7.3.1).

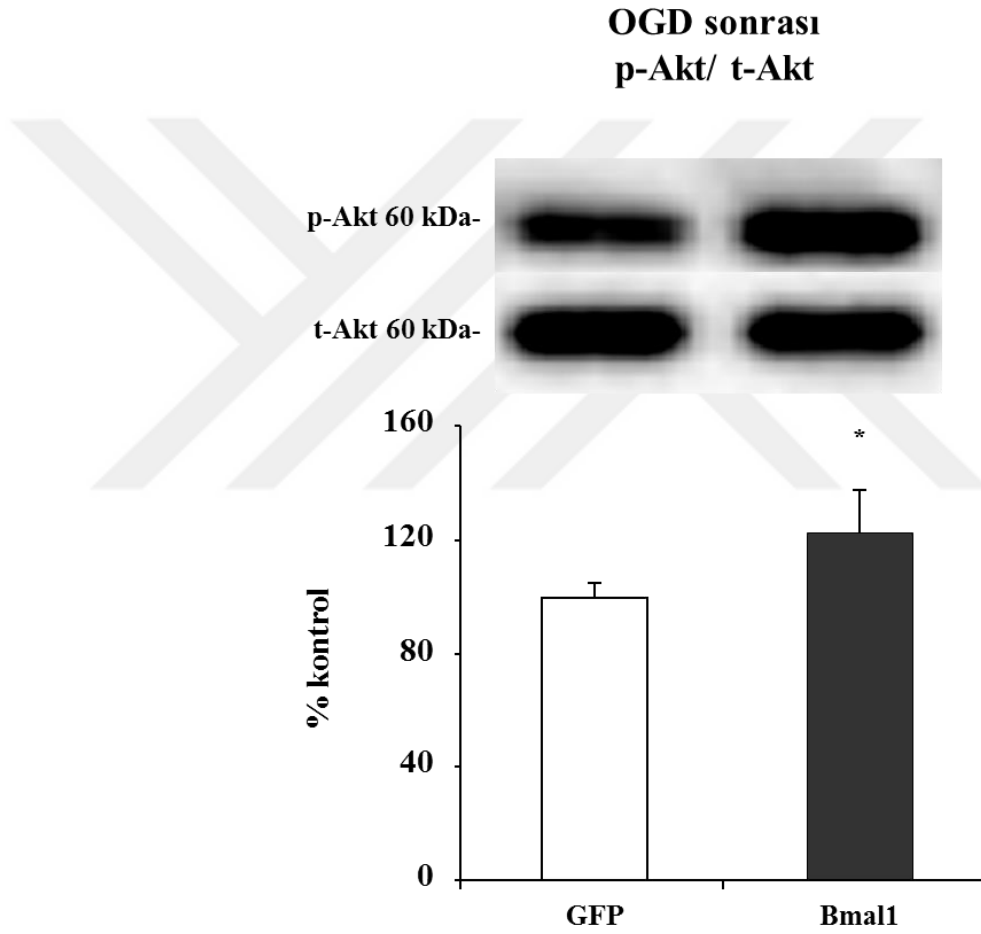
OGD sonrası hücresel sağkalım



Şekil 6.7.3.1. Bmal 1 protein ifadesinin arttırılması sonrası yapılan OGD'nin hücresel sağkalıma etkisi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * p<0.05 GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

6.7.4. Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerin OGD sonrası p-Akt protein seviyesinin değerlendirilmesi

Bmal -1 protein ifadesi arttırılmış olan Neuro2A hücrelerine 18 saat OGD takiben 6 saat reperfüzyon uygulandığında; Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerde, hücresel sağkalımda rol alan p-Akt protein seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. p-Akt proteinini, t-Akt proteinine göre normalize edilmiştir (Bmal 1 p=0,14; Şekil 6.7.4.1).



Şekil 6.7.4.1. Bmal 1 protein ifadesinin arttırılması sonrası yapılan OGD p-Akt protein seviyesine etkisi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında sirkadyen ritim proteinlerinden Bmal 1'in yine sirkadyen ritmi düzenleyen en önemli nöropeptidlerden olan ve nöroprotektif etkisi bilinen melatonin ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, *in vivo* ortamda beyin felci oluşturulan farelerde ve *in vitro* ortamda beyin felci modeli oluşturularak i) apoptotik hücre ölümü, ii) nöronal sağkalım, iii) sirkadyen ritimde rol oynayan sinyal iletim yolları, iv) Akt sinyal iletim yolağındaki değişimler ve v) Bmal 1'in ifadesinin artırılmasıyla hücre içerisinde etkilenen moleküler yollar değerlendirilmiştir. Bu amaçla şartlarda Balb/c farelerine 30 dk deneysel beyin felci (orta serebral arter tıkanması, MCAO) modelinden 30 dk önce beyin içi enjeksiyonla fosfoinositid 3-kinaz/Akt sinyal yolağı inhibitörü olan "Wortmannin" verilmiştir. Akt sinyal yolağının ifadesini arttırmak için ise melatonin tedavisi uygulanmıştır. *In vitro* şartlarda, Neuro2A hücre hattına melatonin tedavisi ile birlikte OGD/hipoksi modeli (18 saat OGD/hipoksi 6 saat reperfüzyon) uygulanmıştır.

Beyin felcinin meydana gelebilmesi için serebral kan akımında kritik bir düşüşün olması gerekmektedir (22, 23, 25). Doku örneklerinde kan akışının anlık, sürekli ve invazif olmayan ölçümlerine izin veren Laser Doppler flowmetry (LDF) sistemi ile serebral iskemi süresince bölgesel serebral kan akışı (rCBF) izlenebilmektedir (159). 30 dk deneysel beyin felci modelinin tekrar edilebilirliğinin kontrolü amacıyla beyin kan akımı LDF cihazı ile beyin felci operasyonları süresince ve reperfüzyon başlangıcından itibaren takip edilmiştir. LDF kayıtları orta serebral arterin beslediği striatum bölgesinden alınmıştır. Set-I ve set-II gruplarına yapılan operasyonlarda serebral kanlanma operasyon öncesine göre yaklaşık %80'lik bir düşüş göstermiştir (Şekil 6.1.1). 30 dakika iskemi sonrasında reperfüzyona izin verilmesi ile kan akımının tekrar hızla arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.1.1). Bu LDF kayıtları ile 30 dk deneysel beyin felci operasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterilmiştir.

30 dk orta serebral arter tıkanmasına bağlı olarak hasar striatum bölgesinde oluşmaktadır. Hasara bağlı olarak bu bölgede apoptotik hücre ölümleri görülmektedir (152, 160). Apoptotik sinyallerin DNA üzerinde kırıklar oluşturması ile açığa çıkan

serbest 3'-OH uçlarına TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan *in-situ* işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme ile apoptotik hücreler tespit edilmiştir (161). Beklenildiği gibi hücre sel sağkalımda rol oynayan PI3K/Akt sinyal yolağının baskılayıcısı Wortmannin grubunda apoptotik hücre sayısının en yüksek değerde olduğu görülürken nöroprotektif etkisini PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden gösterdiği bilinen melatonin tedavisinde en düşük değerde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.2.1). Sirkadyen ritim ve beyin felci arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir çalışmada, gece saatlerinde meydana gelen serebral iskemi ile p-Akt (Thr 308) protein seviyesinin arttığı ve buna bağlı olarak p-p53 protein seviyesinde düşüş meydana gelerek pro-apoptotik sinyallerin azaldığı gösterilmiştir (162). Ayrıca, 00:00 saatlerinde meydana gelen serebral iskemi sonucunda Ser 112 amino asitinin fosforilasyonu ile aktivitesini baskılayarak pro-apoptotik etkiyi tersine çeviren Bad protein seviyesinde bir artış olduğu bulunmuştur (162, 163).

30 dakika beyin felci ardından 72 saat reperfüzyondan sonra striatum bölgesine NeuN nöronal işaretleme kullanılarak nöron boyaması yapılmış, nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Nöronal sağkalımın değerlendirilmesi ile melatonin tedavisinin sağkalan nöron sayısını arttırdığı görülmüştür. PI3K/Akt sinyal yolağı baskılayıcısı Wortmannin, nöronal sağ kalımı azaltmıştır (Şekil 6.3.1). Melatoninin nöroprotektif etkisi olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nöroprotektif etkisi ile beraber hasar alanını azaltmakta ve enflamatuar sinyalleri düzenleyerek nöronal sağkalımı artırmaktadır (20). Yapılan çalışmalarla melatoninin bu nöroprotektif etkisini PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir (150). İskeminin zamana bağlı değişimini gösteren bir çalışmada, nöronal sağkalımı düzenleyen p-Akt protein seviyesinde meydana gelen artışa bağlı olarak nöronal sağkalımda artış olduğu ortaya konulmuştur (162). Literatür ile paralel olarak, yaptığımız çalışmada melatonin uygulaması sonucu, nöronal sağkalımın arttığı gözlemlenmiştir

Bmal 1 ve nöroprotektif bir molekül olan melatonin ilişkisinin anlaşılabilmesi için Western Blot yöntemi ile protein miktar analizleri yapılmıştır. Grupların iskemik striatmaları protein çalışmaları için kullanılmıştır. Hücre ölümü ve hayatta kalımıyla

ilgili Akt (Şekil 6.4.1.1), sirkadyen ritim döngüsünde görev alan Clock (Şekil 6.4.3.1), Bmal 1 (Şeki 6.4.2.1), PerI (Şekil 6.4.4.1), PerII (Şekil 6.4.5.1) proteinlerinin seviyelerine bakılmıştır. Çalışmada, sirkadyen ritmin en önemli temel bileşenleri olan Clock, Bmal 1, PerII protein seviyesinde ve hücresel sağkalımın en önemli sinyal proteini olan p-Akt protein seviyesinde melatonin tedavisi ile artış görülmüştür. Akt'nin baskılanması ile melatonin tedavisine göre protein seviyelerinde düşüş meydana gelmiştir. İskemiden sonra Akt fosforilasyonunun artması ile hücre ölümünün baskılandığı bilinmektedir (164). Akt fonksiyonunun Wortmannin gibi kimyasallarla baskılanması sonucu iskemik hasar artmaktadır (165, 166). Sirkadyen ritmin iskemi üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışmada Clock, Bmal 1, PerI, p-Akt protein seviyelerinde 00:00 zaman diliminde artış olmaktadır. Nöronal sağkalımdaki artışın bu protein seviyelerinde meydana gelen artışa bağlı olduğu ve p-Akt seviyesindeki artışın Bmal 1 proteini ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (162). Clock:Bmal 1 heterodimeri, iskemik koşullarda hasarı arttıran serbest radikal oluşumlarını, Akt sinyal yolağı üzerinden düzenlenen HIF-1 α 'yı aktive ederek baskılamaktadır (15, 167). PerII^{-/-} mutant farelerde de aritmik koşullar meydana gelmektedir (168). Fakat bu tez çalışmasında, beklenilen aksine PerI protein seviyesinde melatonin tedavisiyle düşüş görülmüştür. Melatoninin homeostatik etkisini ve sirkadyen ritim ile ilişkisini inceleyen bir çalışmada, *in vivo* melatonin tedavisinin hipofiz ön lobunun bir parçası olan pars tuberalisinde PerI protein seviyesinde düşüş meydana getirdiği bulunmuştur. Bu sonuçla pars tuberaliste melatoninin PerI proteinin anlatımını baskıladığı düşünülmüştür (169).

Bmal 1 ve melatonin ilişkisinin ortaya konulması için *in vitro* koşullar altında Neuro2A hücre hattına 0,5 mM melatonin tedavisi uygulanmış ve Bmal 1 proteinin melatonin ile değişimine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bmal 1 protein seviyesinin melatonin tedavisi ile birlikte arttığını göstermektedir. Bmal 1 anlatımının gece saatlerinde fazla olmasının nedeni belki de gece salgılanan melatonin hormonundan dolayı olabilir (Şekil 6.5.1).

Beyin felci sonrasında Bmal 1 ve melatonin ilişkisinin ortaya konulması için *in vitro* koşullar altında Neuro2A hücre hattına *in vitro* beyin felci modeli olan OGD modeliyle birlikte 0,5 mM melatonin tedavisi uygulanmıştır. Melatonin tedavisine

bağlı olarak OGD sonrası hücrel sağkalım değeriendirilmiştir. Melatonin tedavisi ile hücrel sağkalımın ve Bmal 1 protein seviyesinin arttığı bulunmuştur. Deneysel beyin hasarında melatoninin etkisini inceleyen bir çalışmada, melatoninin hipoksik koşullar altında serbest radikal oksijen türlerini etkisiz hale getirerek nöroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (170) (Şekil 6.6.2.1).

Bmal 1 ifadesi arttırılmış hücrelerin OGD sonrası hücrel sağkalım oranı ve p-Akt protein seviyesindeki değışim incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre Bmal 1 ifadesi yaklaşık 35 kat arttırılmış Neuro2A hücrelerinin hipoksi sonrası hücrel sağkalım oranında artış görülmüştür (Şekil 6.7.3.1). p-Akt protein seviyesinde de hücrel sağkalım oranında görüldüğü gibi bir artış olduğu bulunmuştur (Şekil 6.7.4.1). Yapılan çalışmalarda, Bmal 1'in Akt fosforilasyonu için 3 korunmuş tanıma motifi içerdiği bulunmuştur. Karaciğerde *de novo* lipogenez ve Bmal 1 ilişkisini anlamak için yapılan bir çalışmada, hepatik Bmal 1'in yeni bir metabolik fonksiyonun olduğu ve insülin-mTORC2-AKT sinyali yoluyla *de novo* lipogenezi teşvik ettiği bulunmuştur(171). Bmal 1'in kanser hücre invazyonundaki rolü ile ilgili yapılan bir çalışmada, Bmal 1'in PI3K-Akt-MMP-2 yolağını bloke ederek hücre invazyonunu baskıladığını bulunmuştur (172) (Şekil 6.5.1).

Beyin felci sonrasında Bmal 1 ve melatonin ilişkisinin ortaya konulması için *in vitro* koşullar altında Neuro2A hücre hattına *in vitro* beyin felci modeli olan OGD/hipoksi modeliyle birlikte 0,5 mM melatonin tedavisi uygulanmıştır. Melatonin tedavisine bağlı olarak OGD/hipoksi sonrası hücrel sağkalım değeriendirilmiştir. Melatonin tedavisi ile hücrel sağkalımın ve Bmal 1 protein seviyesinin arttığı bulunmuştur. Deneysel beyin hasarlarında melatonin etkisini inceleyen bir çalışmada, melatonin hipoksik koşullar altında serbest radikal oksijen türlerini etkisiz hale getirerek nöroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (170) (Şekil 6.6.2.1).

8. SONUÇ

Tüm bu veriler incelendiğinde, beyin felci sonrası melatonin tedavisi ile apoptotik hücre sayısının azaldığı, nöronal sağkalım oranının arttığı, melatonin tedavisi ile sirkadyen ritim proteinlerinden Bmal 1, Clock, PerII ve nöronal sağkalımda rol oynayan p-Akt protein seviyesinde artış olduğu, Akt sinyal yolağının baskılanması ile bu proteinlerin seviyelerinde tedaviye göre azalma olduğu görülmüştür. Hücrelere uygulanan melatonin tedavisi ile Bmal 1 protein seviyesinde artış olduğu bununla birlikte hücrelerin OGD maruz kalmasına rağmen melatonin tedavisiyle Bmal 1 protein seviyesinde artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca Bmal 1 protein ifadesi arttırılmış hücrelerde OGD sonrası hücresel sağkalımın oranının arttığı bununla paralel olarak p-Akt seviyesinde de artış olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, beyin felci sonrası Bmal 1 ve melatonin ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürde bulunan bilgilere göre sirkadyen ritimle beraber değişkenlik gösteren beyin felci vakaları, gece saatlerinde daha az meydana gelmektedir. Bununla beraber sirkadyen ritimin temel moleküler bileşeni olan Bmal 1 ve nöroprotektif melatonin arasındaki bu ilişkinin PI3K/Akt hücresel sağkalım sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu çalışmanın, ileride beyin felcinin patolojik süreçlerinin daha detaylı anlaşılmasına ve beyin felci tedavisinde yeni hedef molekül geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Bonita, R. Epidemiology of stroke. *Lancet* **339**, 342-344. (1992).
2. Caplan, LR, and Hon, FK. Clinical diagnosis of patients with cerebrovascular disease. *Prim Care* **31**, 95-109. (2004).
3. Donnan, GA, Fisher, M, Macleod, M, and Davis, SM. Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623. (2008).
4. Dripps, DJ, Brandhuber, BJ, Thompson, RC, and Eisenberg, SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem* **266**, 10331-10336. (1991).
5. Hacke, W, Donnan, G, Fieschi, C, Kaste, M, von Kummer, R, Broderick, JP, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* **363**, 768-774. (2004).
6. Hacke, W, Kaste, M, Bluhmki, E, Brozman, M, Davalos, A, Guidetti, D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-1329. (2008).
7. Gilligan, AK, Thrift, AG, Sturm, JW, Dewey, HM, Macdonell, RA, and Donnan, GA. Stroke units, tissue plasminogen activator, aspirin and neuroprotection: which stroke intervention could provide the greatest community benefit? *Cerebrovasc Dis* **20**, 239-244. (2005).
8. Gibson, CL. Cerebral ischemic stroke: is gender important? *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 1355-1361. (2013).
9. Paranjpe, DA, and Sharma, VK. Evolution of temporal order in living organisms. *J Circadian Rhythms* **3**, 7. (2005).
10. Roenneberg, T, and Merrow, M. "What watch?...such much!" Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* **309**, 3-9. (2002).
11. Karatsoreos, IN, Bhagat, S, Bloss, EB, Morrison, JH, and McEwen, BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1657-1662. (2011).
12. Elliott, WJ. Circadian variation in the timing of stroke onset: a meta-analysis. *Stroke* **29**, 992-996. (1998).

13. Pardiwalla, FK, Yeolekar, ME, and Bakshi, SK. Circadian rhythm in acute stroke. *J Assoc Physicians India* **41**, 203-204. (1993).
14. Khapre, RV, Kondratova, AA, Susova, O, and Kondratov, RV. Circadian clock protein BMAL 1 regulates cellular senescence in vivo. *Cell Cycle* **10**, 4162-4169. (2011).
15. Razorenova, OV. Brain and muscle ARNT-like protein BMAL 1 regulates ROS homeostasis and senescence: a possible link to hypoxia-inducible factor-mediated pathway. *Cell Cycle* **11**, 213-214. (2012).
16. Raichle, ME. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol* **13**, 2-10. (1983).
17. Camarata, PJ, Heros, RC, and Latchaw, RE. "Brain attack": the rationale for treating stroke as a medical emergency. *Neurosurgery* **34**, 144-157; discussion 157-148. (1994).
18. Ivanova, S, Batliwalla, F, Mocco, J, Kiss, S, Huang, J, Mack, W, et al. Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5579-5584. (2002).
19. Pinsky, DJ, Broekman, MJ, Peschon, JJ, Stocking, KL, Fujita, T, Ramasamy, R, et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* **109**, 1031-1040. (2002).
20. 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 Radic Biol Med* **104**, 32-53. (2017).
21. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397. (1999).
22. Choi, DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 667-672. (1996).
23. Hossmann, KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* **36**, 557-565. (1994).
24. Ito, H, Kanno, I, Hatazawa, J, and Miura, S. Changes in human cerebral blood flow and myocardial blood flow during mental stress measured by dual positron emission tomography. *Ann Nucl Med* **17**, 381-386. (2003).

25. Lee, JM, Zipfel, GJ, and Choi, DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**, A7-14. (1999).
26. Katsura, K, Kristian, T, and Siesjo, BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* **22**, 991-996. (1994).
27. Martin, RL, Lloyd, HG, and Cowan, AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251-257. (1994).
28. Chen, ZL, and Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* **91**, 917-925. (1997).
29. Furukawa, K, Fu, W, Li, Y, Witke, W, Kwiatkowski, DJ, and Mattson, MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* **17**, 8178-8186. (1997).
30. Zhao, Q, Pahlmark, K, Smith, ML, and Siesjo, BK. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand* **152**, 349-350. (1994).
31. Hossmann, KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **8**, 195-208. (1996).
32. Gong, C, Qin, Z, Betz, AL, Liu, XH, and Yang, GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* **801**, 1-8. (1998).
33. Lindsberg, PJ, Hallenbeck, JM, and Feuerstein, G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* **30**, 117-129. (1991).
34. Pirttila, TR, and Kauppinen, RA. Recovery of intracellular pH in cortical brain slices following anoxia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy: role of lactate removal, extracellular sodium and sodium/hydrogen exchange. *Neuroscience* **47**, 155-164. (1992).
35. Rothwell, NJ, and Hopkins, SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* **18**, 130-136. (1995).
36. Ivacko, J, Szaflarski, J, Malinak, C, Flory, C, Warren, JS, and Silverstein, FS. Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1

- expression in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 759-770. (1997).
37. 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).
 38. Leist, M, and Nicotera, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* **239**, 183-201. (1998).
 39. Hara, T, Tan, Y, and Huang, L. In vivo gene delivery to the liver using reconstituted chylomicron remnants as a novel nonviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14547-14552. (1997).
 40. Mattson, MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129. (2000).
 41. Ning, K, Pei, L, Liao, M, Liu, B, Zhang, Y, Jiang, W, et al. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci* **24**, 4052-4060. (2004).
 42. Yuan, J, and Horvitz, HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* **116**, S53-56, 51 p following S59. (2004).
 43. Yeh, CM, Su, SC, Lin, CW, Yang, WE, Chien, MH, Reiter, RJ, et al. Melatonin as a potential inhibitory agent in head and neck cancer. *Oncotarget* **8**, 90545-90556. (2017).
 44. Pevet, P. Melatonin. *Dialogues Clin Neurosci* **4**, 57-72. (2002).
 45. Reiter, RJ, Tan, DX, Manchester, LC, and Tamura, H. Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J Physiol Pharmacol* **58 Suppl 6**, 5-22. (2007).
 46. Pelham, RW. A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy. *Endocrinology* **96**, 543-546. (1975).
 47. Tan, DX, Manchester, LC, Esteban-Zubero, E, Zhou, Z, and Reiter, RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* **20**, 18886-18906. (2015).
 48. Claustrat, B, Brun, J, and Chazot, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* **9**, 11-24. (2005).

49. Sack, RL, Lewy, AJ, and Hughes, RJ. Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. *Ann Med* **30**, 115-121. (1998).
50. Francis, PL, Leone, AM, Young, IM, Stovell, P, and Silman, RE. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clin Chem* **33**, 453-457. (1987).
51. Dubocovich, ML, and Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* **27**, 101-110. (2005).
52. Dubocovich, ML, Rivera-Bermudez, MA, Gerdin, MJ, and Masana, MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* **8**, d1093-1108. (2003).
53. Masana, MI, and Dubocovich, ML. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* **2001**, pe39. (2001).
54. Pechanova, O, Paulis, L, and Simko, F. Peripheral and central effects of melatonin on blood pressure regulation. *Int J Mol Sci* **15**, 17920-17937. (2014).
55. Slominski, RM, Reiter, RJ, Schlabritz-Loutsevitch, N, Ostrom, RS, and Slominski, AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **351**, 152-166. (2012).
56. Reppert, SM, Weaver, DR, and Godson, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 100-102. (1996).
57. Slaugenhaupt, SA, Roca, AL, Liebert, CB, Altherr, MR, Gusella, JF, and Reppert, SM. Mapping of the gene for the Mella-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* **27**, 355-357. (1995).
58. Aranda, ML, Gonzalez Fleitas, MF, De Laurentiis, A, Keller Sarmiento, MI, Chianelli, M, Sande, PH, et al. Neuroprotective effect of melatonin in experimental optic neuritis in rats. *J Pineal Res* **60**, 360-372. (2016).
59. Korkmaz, A, Reiter, RJ, Topal, T, Manchester, LC, Oter, S, and Tan, DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* **15**, 43-50. (2009).

60. Nduhirabandi, F, Lamont, K, Albertyn, Z, Opie, LH, and Lecour, S. Role of toll-like receptor 4 in melatonin-induced cardioprotection. *J Pineal Res* **60**, 39-47. (2016).
61. Reiter, RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* **56**, 359-384. (1998).
62. Rosen, J, Than, NN, Koch, D, Poeggeler, B, Laatsch, H, and Hardeland, R. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-substituted 3-indolinones. *J Pineal Res* **41**, 374-381. (2006).
63. Borlongan, CV, Sumaya, I, Moss, D, Kumazaki, M, Sakurai, T, Hida, H, et al. Melatonin-secreting pineal gland: a novel tissue source for neural transplantation therapy in stroke. *Cell Transplant* **12**, 225-234. (2003).
64. Li, H, Wang, Y, Feng, D, Liu, Y, Xu, M, Gao, A, et al. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. *J Pineal Res* **57**, 110-119. (2014).
65. Soybir, G, Topuzlu, C, Odabas, O, Dolay, K, Bilir, A, and Koksoy, F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* **33**, 896-901. (2003).
66. Ma, Z, Xin, Z, Di, W, Yan, X, Li, X, Reiter, RJ, et al. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci* **74**, 3989-3998. (2017).
67. Lemmer, B. Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. *Chronobiol Int* **26**, 1019-1068. (2009).
68. Dunlap, JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290. (1999).
69. Blum, ID, Zhu, L, Moquin, L, Kokoeva, MV, Gratton, A, Giros, B, et al. A highly tunable dopaminergic oscillator generates ultradian rhythms of behavioral arousal. *Elife* **3**(2014).
70. Tannenbaum, GS, and Martin, JB. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **98**, 562-570. (1976).

71. Yamazaki, S, Numano, R, Abe, M, Hida, A, Takahashi, R, Ueda, M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685. (2000).
72. Yoo, SH, Yamazaki, S, Lowrey, PL, Shimomura, K, Ko, CH, Buhr, ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5339-5346. (2004).
73. Kwon, I, Choe, HK, Son, GH, and Kim, K. Mammalian molecular clocks. *Exp Neurobiol* **20**, 18-28. (2011).
74. Harmer, SL, Panda, S, and Kay, SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 215-253. (2001).
75. Morris, CJ, Aeschbach, D, and Scheer, FA. Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* **349**, 91-104. (2012).
76. Barrett, RK, and Takahashi, JS. Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. *J Neurosci* **15**, 5681-5692. (1995).
77. Takahashi, JS, DeCoursey, PJ, Bauman, L, and Menaker, M. Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature* **308**, 186-188. (1984).
78. Lowrey, PL, and Takahashi, JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 407-441. (2004).
79. Hofman, MA, Fliers, E, Goudsmit, E, and Swaab, DF. Morphometric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes. *J Anat* **160**, 127-143. (1988).
80. Swaab, DF, Fliers, E, and Partiman, TS. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res* **342**, 37-44. (1985).
81. Van den Pol, AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* **191**, 661-702. (1980).

82. Green, DJ, and Gillette, R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* **245**, 198-200. (1982).
83. Groos, G, and Hendriks, J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* **34**, 283-288. (1982).
84. Meijer, JH, Schaap, J, Watanabe, K, and Albus, H. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res* **753**, 322-327. (1997).
85. Hattar, S, Liao, HW, Takao, M, Berson, DM, and Yau, KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 1065-1070. (2002).
86. Moore, RY, Speh, JC, and Card, JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* **352**, 351-366. (1995).
87. Buijs, RM, and Kalsbeek, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* **2**, 521-526. (2001).
88. Balsalobre, A, Marcacci, L, and Schibler, U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* **10**, 1291-1294. (2000).
89. Brown, SA, Fleury-Olela, F, Nagoshi, E, Hauser, C, Juge, C, Meier, CA, et al. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol* **3**, e338. (2005).
90. Nagoshi, E, Saini, C, Bauer, C, Laroche, T, Naef, F, and Schibler, U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**, 693-705. (2004).
91. Welsh, DK, Yoo, SH, Liu, AC, Takahashi, JS, and Kay, SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* **14**, 2289-2295. (2004).

92. Akashi, M, and Takumi, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal 1. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 441-448. (2005).
93. Guillaumond, F, Dardente, H, Giguere, V, and Cermakian, N. Differential control of Bmal 1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* **20**, 391-403. (2005).
94. Sato, TK, Panda, S, Miraglia, LJ, Reyes, TM, Rudic, RD, McNamara, P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**, 527-537. (2004).
95. Oishi, K, Fukui, H, and Ishida, N. Rhythmic expression of BMAL 1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 164-171. (2000).
96. Bunger, MK, Walisser, JA, Sullivan, R, Manley, PA, Moran, SM, Kalscheur, VL, et al. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal 1 locus. *Genesis* **41**, 122-132. (2005).
97. Bunger, MK, Wilsbacher, LD, Moran, SM, Clendenin, C, Radcliffe, LA, Hogenesch, JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009-1017. (2000).
98. Rudic, RD, McNamara, P, Curtis, AM, Boston, RC, Panda, S, Hogenesch, JB, et al. BMAL 1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* **2**, e377. (2004).
99. Shimba, S, Ishii, N, Ohta, Y, Ohno, T, Watabe, Y, Hayashi, M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL 1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12071-12076. (2005).
100. Glossop, NR, Lyons, LC, and Hardin, PE. Interlocked feedback loops within the Drosophila circadian oscillator. *Science* **286**, 766-768. (1999).
101. Lee, K, Loros, JJ, and Dunlap, JC. Interconnected feedback loops in the Neurospora circadian system. *Science* **289**, 107-110. (2000).

102. Shearman, LP, Sriram, S, Weaver, DR, Maywood, ES, Chaves, I, Zheng, B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019. (2000).
103. Gekakis, N, Staknis, D, Nguyen, HB, Davis, FC, Wilsbacher, LD, King, DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564-1569. (1998).
104. King, DP, Zhao, Y, Sangoram, AM, Wilsbacher, LD, Tanaka, M, Antoch, MP, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* **89**, 641-653. (1997).
105. Maywood, ES, O'Brien, JA, and Hastings, MH. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* **15**, 329-334. (2003).
106. Kume, K, Zylka, MJ, Sriram, S, Shearman, LP, Weaver, DR, Jin, X, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205. (1999).
107. Zheng, B, Albrecht, U, Kaasik, K, Sage, M, Lu, W, Vaishnav, S, et al. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**, 683-694. (2001).
108. Lee, C, Etchegaray, JP, Cagampang, FR, Loudon, AS, and Reppert, SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**, 855-867. (2001).
109. Okamura, H, Miyake, S, Sumi, Y, Yamaguchi, S, Yasui, A, Muijtjens, M, et al. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* **286**, 2531-2534. (1999).
110. Sato, TK, Yamada, RG, Ukai, H, Baggs, JE, Miraglia, LJ, Kobayashi, TJ, et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet* **38**, 312-319. (2006).
111. Preitner, N, Damiola, F, Lopez-Molina, L, Zakany, J, Duboule, D, Albrecht, U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260. (2002).

112. Triqueneaux, G, Thenot, S, Kakizawa, T, Antoch, MP, Safi, R, Takahashi, JS, et al. The orphan receptor Rev-erbalpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol* **33**, 585-608. (2004).
113. Akashi, M, Tsuchiya, Y, Yoshino, T, and Nishida, E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol* **22**, 1693-1703. (2002).
114. Eide, EJ, Vielhaber, EL, Hinz, WA, and Virshup, DM. The circadian regulatory proteins BMAL 1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **277**, 17248-17254. (2002).
115. Lowrey, PL, Shimomura, K, Antoch, MP, Yamazaki, S, Zemenides, PD, Ralph, MR, et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**, 483-492. (2000).
116. Toh, KL, Jones, CR, He, Y, Eide, EJ, Hinz, WA, Virshup, DM, et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043. (2001).
117. Xu, Y, Padiath, QS, Shapiro, RE, Jones, CR, Wu, SC, Saigoh, N, et al. Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* **434**, 640-644. (2005).
118. Camacho, F, Cilio, M, Guo, Y, Virshup, DM, Patel, K, Khorkova, O, et al. Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett* **489**, 159-165. (2001).
119. Keesler, GA, Camacho, F, Guo, Y, Virshup, D, Mondadori, C, and Yao, Z. Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport* **11**, 951-955. (2000).
120. Vielhaber, E, Eide, E, Rivers, A, Gao, ZH, and Virshup, DM. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* **20**, 4888-4899. (2000).
121. Naylor, E, Bergmann, BM, Krauski, K, Zee, PC, Takahashi, JS, Vitaterna, MH, et al. The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse. *J Neurosci* **20**, 8138-8143. (2000).

122. Turek, FW, Joshu, C, Kohsaka, A, Lin, E, Ivanova, G, McDearmon, E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308**, 1043-1045. (2005).
123. van den Pol, AN, Finkbeiner, SM, and Cornell-Bell, AH. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J Neurosci* **12**, 2648-2664. (1992).
124. Edgar, DM, Dement, WC, and Fuller, CA. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *J Neurosci* **13**, 1065-1079. (1993).
125. Moore, RY. The fourth C.U. Ariens Kappers lecture. The organization of the human circadian timing system. *Prog Brain Res* **93**, 99-115; discussion 115-117. (1992).
126. Berson, DM, Dunn, FA, and Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070-1073. (2002).
127. Lewy, AJ, Wehr, TA, Goodwin, FK, Newsome, DA, and Markey, SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* **210**, 1267-1269. (1980).
128. Zhao, S, Fu, J, Liu, X, Wang, T, Zhang, J, and Zhao, Y. Activation of Akt/GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway is involved in survival of neurons after traumatic brain injury in rats. *Neurol Res* **34**, 400-407. (2012).
129. Franke, TF, Hornik, CP, Segev, L, Shostak, GA, and Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983-8998. (2003).
130. Fresno Vara, JA, Casado, E, de Castro, J, Cejas, P, Belda-Iniesta, C, and Gonzalez-Baron, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**, 193-204. (2004).
131. Edwards, LA, Thiessen, B, Dragowska, WH, Daynard, T, Bally, MB, and Dedhar, S. Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. *Oncogene* **24**, 3596-3605. (2005).
132. Troussard, AA, McDonald, PC, Wederell, ED, Mawji, NM, Filipenko, NR, Gelmon, KA, et al. Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival. *Cancer Res* **66**, 393-403. (2006).

133. Kilic, E, Kilic, U, Wang, Y, Bassetti, CL, Marti, HH, and Hermann, DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J* **20**, 1185-1187. (2006).
134. Song, G, Ouyang, G, and Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71. (2005).
135. Arcaro, A, and Wymann, MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* **296** (Pt 2), 297-301. (1993).
136. Powis, G, Bonjouklian, R, Berggren, MM, Gallegos, A, Abraham, R, Ashendel, C, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**, 2419-2423. (1994).
137. Liu, Y, Shreder, KR, Gai, W, Corral, S, Ferris, DK, and Rosenblum, JS. Wortmannin, a widely used phosphoinositide 3-kinase inhibitor, also potently inhibits mammalian polo-like kinase. *Chem Biol* **12**, 99-107. (2005).
138. Liu, P, Cheng, H, Roberts, TM, and Zhao, JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 627-644. (2009).
139. Zhao, H, Sapolsky, RM, and Steinberg, GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol* **34**, 249-270. (2006).
140. Alessi, DR, Andjelkovic, M, Caudwell, B, Cron, P, Morrice, N, Cohen, P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **15**, 6541-6551. (1996).
141. Bellacosa, A, Chan, TO, Ahmed, NN, Datta, K, Malstrom, S, Stokoe, D, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**, 313-325. (1998).
142. Chen, R, Kim, O, Yang, J, Sato, K, Eisenmann, KM, McCarthy, J, et al. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 31858-31862. (2001).
143. Hill, MM, Andjelkovic, M, Brazil, DP, Ferrari, S, Fabbro, D, and Hemmings, BA. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is

- independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J Biol Chem* **276**, 25643-25646. (2001).
144. Noshita, N, Lewen, A, Sugawara, T, and Chan, PH. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1442-1450. (2001).
 145. Kilic, E, ElAli, A, Kilic, U, Guo, Z, Ugur, M, Uslu, U, et al. Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 969-984. (2010).
 146. Merchenthaler, I, Dellovade, TL, and Shughrue, PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **1007**, 89-100. (2003).
 147. Morale, MC, Serra, PA, L'Episcopo, F, Tirolo, C, Caniglia, S, Testa, N, et al. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* **138**, 869-878. (2006).
 148. Scharfman, HE, and Maclusky, NJ. Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci* **28**, 79-85. (2005).
 149. Wilson, ME, Liu, Y, and Wise, PM. Estradiol enhances Akt activation in cortical explant cultures following neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res* **102**, 48-54. (2002).
 150. 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. *J Pineal Res* **38**, 67-71. (2005).
 151. 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 Biol* **12**, 657-665. (2017).
 152. 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).

153. Hardeland, R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* **35**, 183-192. (2009).
154. Kilic, E, Kilic, U, Soliz, J, Bassetti, CL, Gassmann, M, and Hermann, DM. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J* **19**, 2026-2028. (2005).
155. Anhe, GF, Caperuto, LC, Pereira-Da-Silva, M, Souza, LC, Hirata, AE, Velloso, LA, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem* **90**, 559-566. (2004).
156. Henshall, DC, Araki, T, Schindler, CK, Lan, JQ, Tiekoter, KL, Taki, W, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* **22**, 8458-8465. (2002).
157. Kim, AH, Yano, H, Cho, H, Meyer, D, Monks, B, Margolis, B, et al. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* **35**, 697-709. (2002).
158. Lee, SH, Chun, W, Kong, PJ, Han, JA, Cho, BP, Kwon, OY, et al. Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. *J Pineal Res* **40**, 79-85. (2006).
159. Dirnagl, U, Kaplan, B, Jacewicz, M, and Pulsinelli, W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 589-596. (1989).
160. 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. *Front Cell Neurosci* **8**, 422. (2014).
161. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516. (2007).
162. 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 Bmal 1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* (2017).

163. Koh, PO. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decreases of astrocytic phosphoprotein PEA-15 and its two phosphorylated forms. *Neurosci Lett* **511**, 101-105. (2012).
164. Chan, PH. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res* **29**, 1943-1949. (2004).
165. Gao, X, Zhang, H, Takahashi, T, Hsieh, J, Liao, J, Steinberg, GK, et al. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *J Neurochem* **105**, 943-955. (2008).
166. Hao, F, Yang, C, Chen, SS, Wang, YY, Zhou, W, Hao, Q, et al. Long-term protective effects of AAV9-mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor gene transfer in parkinsonian rats. *Exp Neurol* **291**, 120-133. (2017).
167. Kondratov, RV, Vykhovanets, O, Kondratova, AA, and Antoch, MP. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL 1. *Aging (Albany NY)* **1**, 979-987. (2009).
168. Bae, K, Jin, X, Maywood, ES, Hastings, MH, Reppert, SM, and Weaver, DR. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* **30**, 525-536. (2001).
169. Valenzuela, FJ, Vera, J, Venegas, C, Pino, F, and Lagunas, C. Circadian System and Melatonin Hormone: Risk Factors for Complications during Pregnancy. *Obstet Gynecol Int* **2015**, 825802. (2015).
170. Tutunculer, F, Eskiocak, S, Basaran, UN, Ekuklu, G, Ayvaz, S, and Vatansever, U. The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int* **47**, 434-439. (2005).
171. Zhang, D, Tong, X, Arthurs, B, Guha, A, Rui, L, Kamath, A, et al. Liver clock protein BMAL 1 promotes de novo lipogenesis through insulin-mTORC2-AKT signaling. *J Biol Chem* **289**, 25925-25935. (2014).
172. Jung, CH, Kim, EM, Park, JK, Hwang, SG, Moon, SK, Kim, WJ, et al. Bmal 1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. *Oncol Rep* **29**, 2109-2113. (2013).

EK-1 ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
18/05/2017	27		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Beyin Felci Sonrası Melatonin ve BMAL-1 proteinin ilişkisinin araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

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

EK-2 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif	Soyadı	SERTEL
Doğum Yeri	Bursa	Doğum Tarihi	12.09.1993
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail	sertelelif@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2016-
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2015

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.	Moleküler Biyolog	İstanbul Medipol Üniversitesi	2016 -
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu

YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
77,5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81,76213	81,88464	71,51425
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi
SPSS	Orta

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

Uluslararası Yayınlar

1. 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. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal 1 and Survival Kinase AKT. Mol Neurobiol. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
2. Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Beker M, Kelestemur T, Sertel E, Ozturk G, Kilic U, Sahin F, Kilic E. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. Exp Neurol. 2017 Jun 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.

Uluslararası Bildiriler

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

Ulusal Bildiriler ve Sözlü Sunumlar

1. Sözlü Sunum- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Dalay A, Altunay S, **Sertel E**, Kilic E, “Effects of Circadian Rhythm on Brain Injury and Related Molecular Mechanisms” 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 20/32, Düzce, 2016.

2. Sözlü Sunum- Kelestemur T, Beker MC, Caglayan AB, Yalcin E, Altunay S, Dalay A, **Sertel E**, Dilden A, Caglayan B, Kilic E, “Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/ Turkey, 2016.
3. Poster- Yalcin E, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, **Sertel E**, Kilic E, “The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress , PC108, Düzce/Turkey, 2016.
4. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, **Sertel E**, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Saarma M, Kilic E, “Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası