



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAMİLE FARELERDE SEREBRAL İSKEMİ SONRASI AKUT
VE KRONİK DÖNEMDE HASAR MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ**

İLAYDA KAYA

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi. AHMET BURAK ÇAĞLAYAN

İSTANBUL – 2020

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji
Öğrenci : İlayda KAYA
Tez Başlığı : Hamile Farelerde Serebral İskemi Sonrası Akut ve Kronik
Dönemde Hasar Mekanizmalarının İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Kampüsü- REMER
Sınav Tarihi : 14.07.2020

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

Danışman

Kurumu

İmza

Dr. Öğr. Üye. Ahmet Burak ÇAĞLAYAN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üye Neşe AYŞİT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. Merve Beker

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

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

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İTHAF

*“Bu tez
BABAMA ve Boncuk ailesine ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Tam düştüm, artık devam edemeyeceğim derken elini uzatıp, sahip olduğu tüm imkanlarıyla eğitimimi sürdürmem için benden sonsuz destek ve tecrübelerini esirgemeyen, her konuda bana rehberlik eden, sayın Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ'a sonsuz saygılarımı sunuyorum.

Bu tezdeki tüm deneyleri yapabilmemi, sonuçları değerlendirebilmemi ve yazabilmemi sağlayan tez danışmanım Dr. Öğr. Üye. AHMET BURAK ÇAĞLAYAN hocama sonsuz şükranlarımı sunuyorum. Tez danışman hocamın yönlendirmesi ve benimle paylaştığı bilgi ve tecrübeleri olmadan deneylerimi yapabilmem, sorunlara çözüm bulabilmem ve tezimi yazabilmem mümkün değildi.

Her zaman gıpta ettiğim, düşüncelerini ve davranışlarını kendime örnek almaya çalıştığım, başım her sıkıştığında danıştığım ve asla yargılanmayıp her zaman bir kardeşi dinler gibi beni dinleyen, akıl veren, yol gösteren, engin bilgi ve tecrübeleri ile bana hem öğretmen hem de bir abi olan Dr. Öğr. Üye. MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER hocama minnettarlığımı sunuyorum.

Tezimin başlamasından, sonuna kadar benden samimiyetini, dürüstlüğünü, gerçek arkadaşlığını, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Tansu GÖVER'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, bu tez sürecinde desteklerini esirgemeyen, değerli laboratuvar ekibime; Dr. Öğr. Üye. Taha KELEşTEMUR, Dr. Öğr. Üye. Berrak ÇAĞLAYAN, Aysun ÇAĞLAYAN, Elif SERTEL, Zeynep BALÇIKANLI, Nilay ATEş, Elif ÖZBAY, İrem ÇULHA TAşKIN, Havva MAMEDOVA ve Mehmet Özgen ALTUNDAş'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Sakinliği, sonsuz sabrı ve insanlara karşı sonsuz anlayışıyla beni her zaman şaşırtan, bir sonraki adımı benden önce düşünüp sonsuz desteğini veren Serdar ALTUNAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

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

Bana akademik hayatımın kapılarını ilk aralayan sayın Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman bana ayıracak bir kahve molası olan Arzuhan KOÇ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Karşılıksız sevginin tanımını bana yaşayarak öğreten, her zaman arkamda dağ gibi duran, bir gün bile kendimi yalnız hissetmeme izin vermeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Beyin Felcinin Patofizyolojisi	5
4.2. Kan Beyin Bariyeri.....	7
4.3. Enflamasyon	7
4.4. Oksidatif stres	8
4.5. Hücre Ölümü.....	9
4.5.1. Apoptoz.....	9
4.5.2. Nekroz	11
4.5.3. Otofaji	11
4.6. Beyin felcinde muhtemel klinik tedaviler ve tedavide karşılaşılan zorluklar ..	12
4.6.1. Doku Plazminojen Aktivatörü (t-PA).....	12
4.6.2. Hipotermi.....	13
4.6.3. Nörogenез.....	13
4.6.4. Anjiyogenez.....	14
4.6.5. Gliogenez	14
4.7. Hamilelik.....	15
4.7.1. Hamilelikte Meydana Gelen Hormonal Değişikler ve Beyin Hasarı Üzerine Etkileri	15

4.7.2. Hamilelik ve Nörodejeneratif Hastalıklar.....	16
4.7.2.1. Multiple Skleroz (MS).....	16
4.7.2.2. Alzheimer Hastalığı	16
4.7.2.3. Parkinson Hastalığı.....	17
4.7.3. Hamilelikte İskemik Hasar.....	17
4.7.4. Hamilelikte İskemi ile İlgili Fizyolojik Süreçler	18
5. MATERYAL ve METOT.....	20
5.1. Deney Dizaynı ve Deney Grupları	20
5.2. Farelerin Çiftleştirilmesi ve Hamileliğin Takibi	21
5.3. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO)	22
5.4. Laser Doppler Flowmetri	22
5.5. Deneyin Sonlandırılması ve Beyinden Örnek Alınması.....	23
5.6. İmmünohistokimyasal Analizler	24
5.6.1. NeuN ile Nöronal Sağkalımının Belirlenmesi	24
5.6.2. Glial Yaranın Değerlendirilmesi	25
5.6.3. DNA Kırıklarının <i>in sitü</i> Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile Belirlenmesi.....	25
5.7. Post-iskemik Atrofinin Belirlenmesi	26
5.8. BrdU ile Hücre Farklılaşmasının Belirlenmesi.....	26
5.9. Boyanan Kesitlerin Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi	27
5.10. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın belirlenmesi	28
5.11. İstatistik	29
6. BULGULAR.....	30
6.1. Serebral Kan Akımının Ölçülmesi	30
6.2. Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi	31
6.3. Kısa Dönemde Hasar Sonrası Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi	33
6.4. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Atrofik Alanların Değerlendirilmesi.....	35
6.5. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Nörogenezin Değerlendirilmesi	37
6.6. İskeminin İndüklenmesinin Ardından Uzun Dönemde Gliogenez Değerlendirilmesi	39
6.7. İskemik Hasarın Ardından Uzun Dönemde Glial Yaranın Değerlendirilmesi ...	41
6.8. İskeminin İndüklenmesinin Ardından Uzun Dönemde Aksonal Projeksiyonun Değerlendirilmesi	42

7. TARTIŞMA	45
8. SONUÇ.....	55
9. KAYNAKLAR	56
10. ETİK KURUL ONAYI.....	72
11. ÖZGEÇMİŞ.....	73



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenozin Trifosfat
BDA	Biyotinlenmiş Dekstran Amin
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
CCL-2	Kemokin Ligandı 2
Cl ⁻	Klor İyonu
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
GFAP	Glia Fibriler Asidik Protein
GSK3 β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 beta
HDM	Hücre Dışı Matriks
IGF1	İnsulin-Like Growth Factor-1
iNOS	Uyarılmış Nitrik Oksit Sentaz
K ⁺	Potasyum İyonu
MS	Multiple Sklerozis
Na ⁺	Sodyum İyonu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NeuN	Neuronal Nuclei
NGS	Normal Keçi Serum
NMD	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OSAO	Orta Serebral Arter Oklüzyonu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PFA	Paraformaldehit
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TGF- β	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü- α
t-PA	Doku Plazminojen Aktivatörü
TRAIL	TNF-Bağımlı Apoptoz İndükleyen Ligand
TUNEL	Terminal Transferase Biotinylated-dUTP nick end labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ŞEKİLLERİN ve TABLOLARIN LİSTESİ

	Sayfa No.
Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.	20
Şekil 6.1.1. Kısa dönem için Lazer Doppler beyin kan akım kayıtları.	30
Şekil 6.2.1. İskemik hasar sonrası apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi.	31
Şekil 6.3.1. İskemik hasar sonrası nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.	33
Şekil 6.4.1. İskemik hasar sonrası atrofinin cresyl violet boyaması ile değerlendirilmesi.	35
Şekil 6.5.1 İskemik hasar sonrası yeni oluşan nöronların değerlendirilmesi.	37
Şekil 6.6.1. İskemik hasar sonrası gliogenezin değerlendirilmesi.	39
Şekil 6.7.1 İskemik hasar sonrası glial yara alanının değerlendirilmesi.	41
Şekil 6.8.1. İskemik hasar sonrası aksonal uzamanın fasiyal nükleus seviyesinde değerlendirilmesi.	42
Tablo 1. Antikorlar ve Dilüsyon Oranları.	29
Tablo 2. Bulguların şematik gösterimi.	44

1.ÖZET

HAMİLE FARELERDE SEREBRAL İSKEMİ SONRASI AKUT ve KRONİK DÖNEMDE HASAR MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ

Hamilelik ve doğum sonrası dönemde, hormonal değişimleri içeren birçok fizyolojik olayın meydana geldiği bilinmektedir. Meydana gelen hormonal değişimler hamileliğin korunmasına ve plasentanın gelişimine katkı sağlamaktadır. Yapılan literatür çalışmaları ile lohusalık döneminde hemorajik ve normal iskemi meydana gelme riskinin arttığı görülmektedir. Bunun sebebi olarak hamilelik ve lohusalık döneminde, hormonal değişimlere bağlı olarak beyin dinamiğinde meydana gelen değişimler gösterilmektedir. Ek olarak, hamilelik ve doğum sonrasında, iskeminin patofizyolojik süreçleri üzerinde iyileştirici etkilerinin olduğuna inanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile çiftleşme deneyimi olan farelerin, çiftleşme deneyimi olmayan farelere kıyasla iskemi sonrası beyindeki enfarkt hacimlerinin daha küçük olduğu, astrosit ve mikroglia sayısında azalma meydana geldiği, pro-enflamatuar sitokinlerin sayısının azaldığı, büyüme faktörlerinin ise sayılarının arttığı gösterilmektedir. Aynı zamanda iskemi sonrası, daha önce çiftleşmiş farelerde, çiftleşmemiş farelere kıyasla eksitotoksitenin daha fazla iyileştirme gösterdiği ve anjiyogenezin arttığı bilinmektedir. Altta yatan tüm bu mekanizmalar net olarak anlaşılammış olsa da hamilelik ve doğumun iskemi üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bu tezde hamileliğin iskemik hasar üzerindeki etkilerinin anlaşılması amacıyla, hamile ve hamile olmayan farelerde orta serebral arter tıkanması metodu kullanılmıştır. Farelerde serebral iskemi sırasında hamilelik, beyin kan akımında ve apoptotik hücre sayısında bir değişim meydana getirmemiştir. Ancak nöronal sağ kalımı, nörogenezi ve aksonal projeksiyonu artırdığı ve gliogenezi, glial yara alanını ve striatumda meydana gelen atrofiyi azalttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Hamilelik, Serebral İskemi, Glial Yara, Aksonal Projeksiyon, Gliogenezi, Atrofi

Bu tez TÜBİTAK 217S453 nolu proje kapsamında yapılmıştır.

2.ABSTRACT

INVESTIGATION OF INJURY MECHANISMS ON PREGNANT MICE IN THE ACUTE AND CHRONIC TERM AFTER CEREBRAL ISCHEMIA

It is well-known that many physiological events involving hormonal changes occur during pregnancy and postpartum period. The hormonal changes that take place contribute to the protection of pregnancy and development of the placenta. In the literature it has been reported that the risk of hemorrhagic and ischemic stroke during the period of postpartum increased. This observation has been attributed to the changes in the brain dynamics due to hormonal variations during pregnancy and postpartum period. In addition, pregnancy and postpartum are believed to have healing effects on the pathophysiological processes following ischemia. Studies have shown that ischemic multiparous mice have smaller infarct volumes in the brain after ischemia, decreased number of astrocytes, microglia and amount of pro-inflammatory cytokines, but increased number of growth factors when compared to ischemic virgin mice. It is also known that excitotoxicity is alleviated and angiogenesis is induced after ischemia in multiparous mice when compared with virgin mice. Although all of these underlying mechanisms are not clearly understood, it has been suggested that pregnancy and delivery may have protective effects on ischemia. In this thesis, in order to understand the effects of pregnancy on ischemic damage middle cerebral artery occlusion method has been performed in pregnant and non-pregnant mice. Cerebral blood flow and apoptotic cell counts were not altered in pregnant mice which were exposed to ischemia/reperfusion injury. However, we observed increased neuronal survival, neurogenesis and axonal projection, and reduced atrophy, glial scar area and gliogenesis in the striatum.

Keywords: Pregnancy, Cerebral Ischemia, Glial Scar, Axonal Projection, Gliogenesis, Atrophy

This thesis is funded by TUBITAK 217S453 project.

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre dünya genelinde meydana gelen ölüm vakaları arasında serebrovaskular hastalıklar ikinci sırada yer almaktadır. Beyin felcinin kesin ve etkin bir tedavisi olmamakla birlikte en etkili müdahalenin doku plazminojen aktivatörünün ilk dört saat içerisinde intravenöz uygulaması olduğu düşünülmektedir (1, 2). İskemik inme, beyinin oksijensiz ve besinsiz kalarak, serebral kanlanma oranının %20'nin altına düşmesine sebep olan patofizyolojik bir durumdur. Serebral kan akımında meydana gelen %80'lik bu azalma, nöronların beslenememesine sebep olmaktadır (3). Bu nedenle, iyonik gradient bozularak gerekli olan enerji ihtiyacı da karşılanamamaktadır. Aynı zamanda beyinde meydana gelen glikoz ve oksijen eksikliği, beyin hücrelerinde birçok farklı kaskad mekanizmasını aktive etmektedir (4). Kaskad mekanizmalarının aktivasyonuna bağlı olarak, hasar hacminin meydana geldiği düşünülmektedir. Kaskad mekanizmalarının aktivasyonu ile birlikte damarlarda genişleme ve dolaşım bozuklukları, nekroz ve apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmaları da aktive olmaktadır (5). Kaskad mekanizmalarının aktivasyonu ise Na^+/K^+ ATPaz pompasında meydana gelen fonksiyonel bozulmalarla ilişkilendirilmektedir. Na^+/K^+ ATPaz pompasında meydana gelen bozulmalar ise nöron membranını depolarize eder ve voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına sebep olarak eksitatör aminoasitlerin hücre dışı matrikse (HDM) salınımı gerçekleştirmektedir (6). Eksitatör aminoasitlerin perisinaptik uçtan geri alınırken duyduğu enerji ihtiyacı karşılanamadığı için sinaptik boşlukta Ca^{+2} birikmektedir. Ca^{+2} 'nin post sinaptik uçtan alınması için ise glutamata ihtiyaç duyulmaktadır. Glutamat, NMDA reseptörleri üzerinden Ca^{+2} 'nin hücre içerisine alınmasını artırarak hücreleri nekroza yönlendirmektedir (7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2017 yılında yapılan araştırmalar sonucu her yıl 800.000 insanın beyin felci geçirdiği bilinmektedir. Literatürde yapılan diğer çalışmalar ise kadınların erkeklere göre beyin felci geçirme yüzdelerinin daha fazla olduğunu göstermektedir (8). Kadınlarda iskemi riskinin daha fazla olmasının sebebi, kadınların geçirdiği hamileliklere bağlı olarak meydana gelen hormonal değişimlerdir. Kadınlar için beyin felcinin hamilelik sırasında en yüksek olduğu zaman aralığı doğumdan 2 gün önce ve doğumdan 1 gün sonra olarak tanımlanmaktadır (9).

Hamilelik ve doğum sonrası dönem, vücuttaki hormonal değişimleri de beraberinde getirmektedir. Bu hormonal değişimler hamileliğin korunması için hayati önem taşımakta ve ayrıca diğer nöroendokrin olaylar ile birlikte hamileliğin korunmasını da sağlamaktadır (10). Bu şekilde gerçekleşen hormonal değişimlerin plasentanın gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (11). Hamilelik sırasında meydana gelen hormonal değişimlerin, MS, Parkinson, Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıklar üzerinde iyileştirici etkileri olduğu düşünülmektedir. Erken yaşlarda meydana gelen doğumlarda iskemik inme riskinin az olduğu belirtilirken, ileriki yaşlarda meydana gelen hamileliklerde iskemik inme riskinin yaşa bağlı arttığı görülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda hamileliğin ve doğum yapmanın iskemi üzerindeki etkilerinin farklı olabileceği düşünülmektedir (12-17).

Yapılan tez kapsamında, hamileliğin, iskemi üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacıyla hamile olan ve hamile olmayan farelere iskemi indüklenerek, kronik ve akut dönemde meydana gelen değişimleri incelemek amaçlanmaktadır. Hamile olan ve hamile olmayan farelere iskemi indüklenmesinin ardından, beyinler disekte edilecek ve disekte edilen beyinlere immünohistokimyasal analizler yapılacaktır. İlk olarak, iskemi modelinin doğru indüklendiğini göstermek amacıyla LDF kayıtları alınacak ve bu kayıtlar hamile olan ve hamile olmayan fareler için değerlendirilecektir. Ardından elde edilen kesitlere uygun boyamalar yapılarak, iskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan farelerdeki apoptotik hücre sayısında, nöronal sağkalımda, atrofide, nörogenezde, gliogenezde, glial hasarda ve aksonal projeksiyonda meydana gelen değişimleri değerlendirmek hedeflenmektedir.

4.GENEL BİLGİLER

Beyin felci dünyada ölüme sebep olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alırken, 40 yaşından sonra beyin felci geçiren bireylerde engelliliğe sebep olan hastalıklar arasında birinci sırada yer almaktadır. Yapılan çalışmalar ise beyin felci tedavisi için henüz net bir tedavi yöntemi sunamamaktadır. Fakat tedavi yöntemleri hastanelerde bulunan rehabilitasyon merkezleri sayesinde oldukça değişmiş bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile beyin felcinde rol alan biyolojik belirteçler belirlenmeye çalışılmakta bu sayede ön tanılarının ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır (1).

İskeminin gerçekleşmesinin ardından, kan akımının tekrar sağlanması iskeminin tedavi edilmesinde ana terapötik yöntem olarak hedeflenmektedir. Kardiyak arrest sonucu meydana gelen iskemi global iskemi olarak tanımlanmaktadır ve global iskeminin ortadan kaldırılabilmesi için bozulan kan dolaşımının yeniden sağlanması gerekmektedir. Fokal iskemide ise pıhtı veya embolinin gerçekleşmesinin ardından damar tıkanıklığı meydana gelmekte ve bunlara bağlı olarak bölgesel kan akımı durmakta ya da azalmaktadır. Fokal iskemi için hedeflenen tedavi yöntemi ise pıhtı ve emboliyi ortadan kaldırmak yani trombolizdir (18). İskemik beyin hasarının ortadan kaldırılması için doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ya da damarın cerrahi olarak açılması gibi terapötik veya cerrahi yaklaşımlar mevcuttur. Fakat mevcut olan bu yaklaşımların tüm hastalara uygulanamaması nedeniyle kısıtlı bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku plazminojen aktivatörünün zamanlama kısıtlamasının olduğu gibi bu tedavi yöntemi iskemi hastalarının sadece %3,0 -8,5'lük kısmına uygulanabilmesi de bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (19).

4.1.Beyin Felcinin Patofizyolojisi

İskemik inme, beynin oksijensiz ve besinsiz kalması sebebi ile ortaya çıkan patofizyolojik bir durumdur. İskemik beyin felcinden kaynaklanan hasarın, beynin etkilendiği bölgede serebral kan akımının %80 oranında düşürdüğü bilinmektedir (3). Serebral kan akışındaki düşüş, nöronların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Serebral kan akımının %20'lere düşmesinden ötürü, canlı olan hücreler oksijen ve glikoz ihtiyacını karşılayamamaktadır. Tüm bunların yanında nöronların

fonksiyonları bozulduğu için iyonik gradient bozulmakta ve hücrelerin ihtiyacı olan enerji de sağlanamamaktadır (20). İskemik hasar gerçekleştiğinde, beyne giden kan akışı azalmaktadır (21). Kan akımında meydana gelen düşüş ise nöronların geri dönüşümsüz olarak hasara uğraması ile sonuçlanmaktadır (22). Serebral dokuya kan akışının sağlanamamasından dolayı nöronal metabolizma bozulmakta, buna bağlı olarak dokuda oksijen eksikliği yaşanmakta ve beyin hücrelerinde birden çok kaskad mekanizması aktive olmaktadır. Kaskad mekanizmasına bağlı olarak beyinde enfarkt hacim oluşmaktadır (4).

Buna ek olarak kaskad mekanizmalarının aktivasyonu ile inme sırasında damarlarda genişleme ve dolaşım bozuklukları, nekroz ve apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmaları aktive olmaktadır (5). Tüm bu kaskad mekanizmaların aktivasyonu Na^+/K^+ ATPaz pompasında meydana gelen fonksiyonel bozulmalardan kaynaklanmaktadır. Na^+/K^+ ATPaz pompasında meydana gelen bu bozukluklar ise nöronal membranın polarizasyonu bozmakta ve membranı depolarize etmektedir. Depolarize olan membranda voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları açılarak aktive olur ve presinaptik voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasıyla birlikte eksitator aminoasitlerin hücre dışı matrikse (HDM) salınımı gerçekleşmektedir (6). Eksitator aminoasitlerin post-sinaptikten uçtan geri alınımı için enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır fakat enerji ihtiyacı karşılanamadığından dolayı bu işlem gerçekleşmemekte ve hücre dışına salınan Ca^{+2} , sinaptik boşlukta birikmektedir. Salınan Ca^{+2} , post-sinaptik nöronlar için uyarıcı bir etki oluşturmaktadır. Ca^{+2} 'lerin post-sinaptik uçtan geri alınabilmeleri için glutamata ihtiyaç duymaktadır. İskeminin meydana gelmesi hücre dışında glutamat birikmesine sebep olmaktadır (7).

Bunun için glutamat uyarımını sağlayacak olan N-metil-D-aspartat (NMD) ve *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) reseptörleri aktive olmaktadır (23). Böylelikle iyonotropik (NMDA) olan glutamat reseptör ailesi ile hücre içerisine Ca^{+2} girişi artmaktadır. NMDA reseptörleri ile Ca^{+2} 'nin post-sinaptik uçtan geri alınımı uzun vadeli potansiyelin gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Glutamat, NMDA reseptörleri üzerinden Ca^{+2} 'nin hücre içerisine alınmasını artırarak hücreleri nekroza yönlendirmektedir. Glutamat aracılı uyarım sonucu hücre içerisine AMPA ve Kainat reseptörleri aracılığıyla Na^+ ve Cl^- iyonları girmektedir. Na^+ ve Cl^-

iyonlarının hücre içerisine girmesini su takip etmekte ve beyinde ödem oluşumuna sebep olmaktadır (24). Global iskeminin meydana gelmesi beyni besleyen iki veya dört damarın geçici olarak tıkanması ile gerçekleşirken, fokal iskemi genellikle orta serebral arterin tıkanması sonucu meydana gelmektedir (18).

4.2.Kan Beyin Bariyeri

Kan-beyin bariyeri, beyin parankim dokusu ile kanı ayıran bir yapı görevini görmektedir ve farklı endojen ve ekzojen kaynakların beyin parankimasına geçişini kısıtlayan hücrelerden meydana gelmektedir. Aynı zamanda gerekli olan besin ve diğer maddelerin beyine ulaşmasını sağlarken, diğer zararları maddelerin beyine geçişini kısıtlamaktadır. Kan-beyin bariyeri, beynin dinamik ve fonksiyonel yapısını korumak amacıyla, astrositler, perisitler, nöronlar ve diğer destekleyici hücreler ile yakından etkileşmekte olan beyin endotel hücrelerinden meydana gelmektedir (25). Akut iskemi sırasında kan-beyin bariyeri bütünlüğü bozulmaktadır (1). İskemik hasar sonrası, kan-beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak geri dönüşümsüz nöronal hasarlar oluşmaktadır. Kan-beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulması iskemik hasarda meydana gelen patofizyolojik bir süreçtir (26).

4.3.Enflamasyon

Beyin bütünlüğünü ve plastisiteyi korumada önemli bir rol oynayan mikroglialar, beyindeki toplam hücre popülasyonunun %10'unu oluşturmakta ve patofizyolojik hasar meydana geldiğinde en hızlı yanıt oluşturan ve ortamdaki zararlı sinyallerin ortadan kaldırmasını sağlayan hücre tipi olarak bilinmektedir (27, 28). Beynin ana bağışıklık hücreleri olarak tanımlanan bu hücreler, beyinde aktif olup olmama durumlarına bağlı olarak M1 formu ve M2 formu olarak bulunmaktadır. M1 olarak bilinen formu pro-enflamatuar fenotip olarak tanımlanırken, M2 olarak bilinen formu anti-enflamatuar fenotip olarak tanımlanmaktadır. M1 formu, lipopolisakkarit uyarımı ile indüklenirken, M2 formu interlökin-4/10 uyarımı ile indüklenmektedir (29). Pro-enflamatuar olarak tanımlanan M1 formdaki mikroglialar, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 β ve interlökin6 gibi birçok pro-enflamatuar sitokinlerin salınımı ile karakterize edilmektedir ve bu form fagositik kapasiteye sahiptir. Anti-enflamatuar olarak tanımlanan M2 form mikroglialar ise hücre sağkalım

ve tamir mekanizmalarında görev almaktadırlar ve *transforming growth factor* (TGF- β), *nerve growth factor*, IL-4, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor-1* (IGF1), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) gibi sitokinlerin salınımını sağlamaktadırlar (30). Hasarlı bir dokuda M1 fenotipinin aktif olması dokudaki enflamatuvar yanıtı artırırken, M2 fenotipinin aktif olması dokudaki hasar onarımı ve iyileşme mekanizmalarını indüklenmektedir (31).

4.4. Oksidatif stres

İskemik inmenin patofizyolojisinde meydana gelen oksidatif streste, serbest oksijen türlerinin kritik bir rol oynadığı literatür çalışmaları ile gösterilmektedir (32). Bir damarın tıkanması ile oluşan iskemik inme, beynin iskemik bölgesine kan ve glukoz akışının azalmasına sebep olduğu için beyinde enerji açlığı ortaya çıkmaktadır. Çünkü glikoz ve oksijen akışının azalması ATP üretilmesini engellemektedir (33). Na^+ - K^+ ATPaz pompaları hücre içerisindeki enerjinin %30'unu kullanmaktadırlar ve bu pompalar enerji eksikliğinden etkilenmektedirler. Na^+ - K^+ ATPaz pompaları düzgün çalışmaması ise, nöronların depolarize olmasına sebep olmaktadır (34). Buna bağlı olarak NMDA ve AMPA reseptörleri ortamda artan glutamat ile daha fazla uyarılmakta ve bunun sonucunda hücre içine Ca^{+2} girişi artmaktadır. Ortamdaki iyonik gradientin bozulmasına bağlı olarak mitokondrinin membran geçirgenliği bozulmakta ve serbest oksijen radikallerinin ortama salınımları gerçekleşmektedir. Tüm bunların yanında hücre içerisine aşırı glutamat ve Ca^{+2} alınımı, hücre içerisinde çok sayıda proteaz ve lipaz gibi endojen enzimleri aktive etmektedir. Bu enzimler arşidonik asidi serbest yağ asitlerine dönüştürmektedir. Serbest yağ asitleri ise, serbest oksijen türlerinin üretilmesine sebep olmaktadır. Aynı zamanda NADPH'nin oksidasyonu hücre içerisinde Ca^{+2} birikimi tetiklemekte ve hücre içerisinde süperoksit birikimine yol açmaktadır. Süperoksitler mevcut olan oksidatif stresin daha kötüleşmesine sebep olurken, glutatyon transferaz enzimi NADPH'nin oksidasyonuna dahil olarak mitokondrinin ölümüne sebep olmaktadır (35). İskemi sırasında serbest oksijen türlerinin miktarının arttığına bilinmesine rağmen, reperfüzyon aşamasında oksijenlenme miktarı arttığından dolayı serbest oksijen türlerinin miktarının daha da arttığı bilinmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar ile oksijenin, serbest oksijen türlerinin oluşmasına sebep olan ana kaynak olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında,

serbest oksijen türlerinin, nitrik oksit sentaz (NOS) ya da mitokondriden köken alabileceği de düşünülmektedir. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), uyarılmış nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere 3 tür nitrik oksit sentaz (NOS) bulunmaktadır(36). eNOS ve nNOS kalsiyum bağımlı olarak çalışırken, iNOS kalsiyum bağımlı olarak çalışmamaktadır. Ayrıca nNOS ve iNOS'un iskemik hasarın erken ve geç evrelerinde nöronal hasarla ilgili olduğu düşünülürken, eNOS'un nöroproteksiyon görevi olduğu düşünülmektedir (37). NOS'lar vazodilatasyonu sağlama (38), endoteli koruma, adezyon ve agregasyonu engelleme (39), lökositlerin kemotaksis sitelerinde(40), beyin kan akışını korumada (41) görev aldığı gibi, nörotransmitter (42) olarak da görev alabilmektedirler. Fakat tüm bunların yanında nitratin kararsız bir izoformu olan ONOO⁻ (peroksinitrit), NO⁻ ile serbest O₂⁻'nin reaksiyona girmesiyle oluşur ve oluşan ONOO⁻, lipid peroksidasyonuna ve apoptoza yol açacak DNA kırıklarının oluşmasına ve mitokondri stabilitesinin bozulmasına, bununla birlikte antioksidan özellikteki enzimlerin tüketilmesine ve kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olmaktadır (43).

4.5.Hücre Ölümü

Serebral iskeminin gerçekleşmesinin ardından hücre içerisinde birçok ölüm mekanizması aktive olmaktadır. Eksitotoksikite ve oksidatif stres sonucunda hücrelerin aşırı uyarılması, membran potansiyelinin bozulması ve hücre içerisinde Ca⁺² miktarının aşırı artışı hücreleri nekroza ya da daha kontrollü bir savunma mekanizmaları olan apoptoz ve otofajiye götürmektedir.

4.5.1.Apoptoz

Apoptoz gelişme ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonunu korumak amacıyla ortaya çıkan bir homeostazi mekanizması olarak tanımlanmaktadır (44). Apoptozun fizyolojik koşullarda homeostazi özelliğinin olmasının yanı sıra, enerji eksikliğinin olduğu durumlarda da ortaya çıkmaktadır (45). Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, iske mi gibi birçok nörolojik hasarların patofizyolojilerinde de ortaya çıkmaktadır. Bu ölüm mekanizması, pro-apoptotik ve anti- apoptotik genlerin arasındaki sinyalizasyonlarla düzenlenmektedir (46). Yapılan araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir. Bunlardan ilki ekstrinsik

yani ölüm reseptörleri aracılı yol olarak tanımlanırken, diğeri ise intrinsik yani mitokondriyal yol olarak tanımlanmaktadır (47). Mitokondrinin stabilitesinin bozulmasıyla birlikte, mitokondride bazı sinyal yolları aktive hale gelerek intrinsik uyarıların aktive olmasını sağlarken, hücre membranında bulunan ölümle ilgili Tümör Nekroz Faktörü (TNF), Fas/CD95, TNF-bağımlı apoptoz indükleyen ligand (*TRAIL*) gibi reseptörlerin uyarılması sonucu ekstrinsik sinyal mekanizmaları aktive hale gelmektedir (48). Serebral iskemik hasar sonucu bilişsel işlev bozuklarının arasında inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve nekroz olduğu bilinmektedir (49). Literatürde yapılan çalışmalarda, serebral iskemisi sırasında ekzitotoksisitenin artmasına bağlı olarak NMDA ve AMPA reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu hücre içerisinde aşırı miktarda Ca^{+2} biriktiği gösterilmektedir. Hücre içerisinde biriken Ca^{+2} iyonu birçok sinyal mekanizmasının aktivasyonuna sebep olmaktadır(50). Mitokondriyal, yani intrinsik yolda, hücre ölüm mekanizmaları Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmekte ve düzenlenmektedir (51). Mitokondri membranında bulunan BCL-2 ailesinin Bcl-2, Bcl-XL, Bclw gibi bazı üyeleri anti-apoptotik özelliğine sahip oldukları için mitokondriyal membranın korunmasına yardım ederken, Bax, Bak, Bad, Bim, Bid gibi bazı üyeleri ise pro-apoptotik özelliğine sahip oldukları için mitokondriyal membranın parçalanmasına sebep olmaktadır. BCL-2 ailesine ait anti-apoptotik özelliğe sahip olan Bax, Bak, Bad, gibi proteinler mitokondriyal membranın geçirgenliğini bozarak, mitokondriden sitokrom c salınımını tetiklemektedir (45). Sitokrom c salınım mekanizmasını hücre içerisinde biriken Ca^{+2} iyonu ile başlatmaktadır. Hücre içerisine giren Ca^{+2} iyonu, mitokondri membranında bulunan ve anti-apoptotik özelliğe sahip olan Bcl-2'nin parçalanmasını sağlayarak, pro-apoptotik Bid'i aktive etmektedir. Bu sayede aktive hale gelen pro-apoptotik özellikteki Bid, Bad-Box ile birleşerek mitokondri membranında porlar açmaktadır. Bu sayede mitokondriden sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörlerin salınımı gerçekleşmektedir. Mitokondriden salınarak sitozole çıkan sitokrom c, apoptotik proteaz indükleyici faktör 1 ve pro-kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan apoptozom kompleksi ise kaspaz-3 proteazı aktive ederek hücrede DNA hasarına ve apoptotik hücre ölümüne sebep olmaktadır (52).

Ölüm reseptörleri aracılı olan yani ekstrinsik yolda ise, TNF ailesi görev almaktadır. TNF ailesine ait olan herhangi bir ligand membranda bulunan ölüm

reseptörlerinden birine bağlanarak ve sitokrom c salınımına gerek duymadan kaspazları aktive etmektedir. Bu sayede aktive olan kaspaz kaskadı ile kaspaz 8 ve kaspaz 10 aktive hale gelerek kaspaz 3 enzimini aktive etmektedir. Kaspaz 3 proteaz, mitokondri membranının bütünlüğünü bozarak DNA hasarına ve apoptotik hücre ölümüne sebep olmaktadır (53).

4.5.2.Nekroz

Hücre ölümleri doku homeostazisinde, gelişim ve dejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır (54). Nekroz düzensiz bir hücre ölümü olarak kabul edilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar ile iskemi, travma enfeksiyon durumlarında ortaya çıktığı bilinmektedir (55). Nekroz, apoptotik hücre ölümünden farklı bir mekanizmaya sahiptir. Nekrotik hücre ölümünde, hücre membranı parçalanarak hücre patlamaktadır. Hücre membranının parçalanmasıyla hücreye ait olan organeller ve enflamasyon ile ilgili olan moleküller hücre dışına salınmaktadır. Böylelikle patlayan hücre etrafında inflamasyon başlamaktadır (56). Hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasıyla, hücre için gerekli enerji üretilmemekte, reaktif oksijen türleri ortamda artmakta ve Ca^{+2} iyonunun hücre içerisinde artması ile birlikte homeostazi bozulmaktadır (57). İskemi sonucu damarlarda meydana gelen tıkanma ile hiporeperfüzyon gerçekleşmektedir. Hiporeperfüzyona bağlı olarak, glikoz ve enerji eksikliği meydana gelmektedir. Hücre içi homeostazinin bozulmasına bağlı olarak ATP üretimi durmakta ya da yavaşlamaktadır. Hücre membranının geçirgenliğinin bozulması ile hücre içerisine aşırı miktarda Na^{+} alınımı gerçekleşirken hücre dışına ise K^{+} salınımı gerçekleşmektedir. Bu durumda hücre içinde biriken Na^{+} , hücre içindeki mevcut ozmotik basıncı bozmakta ve hücrenin şişerek patlamasına neden olmaktadır. Nekrotik hücre ölümünde reseptörle etkileşen kinazlar görev almaktadır (58).

4.5.3.Otofaji

Otofaji, lizozomların yer aldığı katabolik bir süreçtir (59). Hücre membranı, hücre içinde bulunan organel ve makrofajları içine alacak şekilde katlanarak otofagozom yapısını oluşturmakta ve otofagozom içindeki yapıları degradasyonları için lizozoma sunmaktadır (60). Otofaji aracılığıyla sindirime uğrayan protein ve

organellerden elde edilen materyaller, enerji eksikliği ve besin yetersizliği gibi durumlarda hücre için yeniden kullanılabilir (61). Otofajinin başlama/indüklenme, otofagozom formasyonu ve maturasyon/geri dönüşüm süreçleri olmak üzere 3 aşamadan meydana geldiği düşünülmektedir. İlk olarak sitoplazmik bileşenler otofagozom içine hapsedilmekte (ayırma evresi), ardından liozozomal hidrolazların yardımı ile otofagozom degrade edilmekte (degredasyon), son olarak degrade olan protein ve organellerden elde edilen materyallerin ihtiyaç durumunda tekrar kullanımı (geri dönüşüm) aşamaları sırasıyla gerçekleşmektedir (62). İskemik hasar sonrası otofajinin gerçekleştiği düşünülse de otofajinin iskemik hasardaki rolü tam olarak bilinmemektedir (63).

4.6.Beyin felcinde muhtemel klinik tedaviler ve tedavide karşılaşılan zorluklar

4.6.1.Doku Plazminojen Aktivatörü (t-PA)

İskemik inmenin genellikle kan pıhtılarının arterleri tıkanması sonucu olduğu düşünülmektedir. Rekombinant doku plazminojen aktivatörü Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilmiş olan ve beyin felci için kullanılan tek tedavi yöntemi olarak bilinmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar, doku plazminojen aktivatörünün tedavi amaçlı kullanılabilmesi için hastalığın ne zaman başladığının bilinmesi gerektiğini ve hastalığın meydana gelmesinden 3-4 saat sonra t-PA'nın etkinliğinin bulunmadığını göstermektedir (64). t-PA'nın belirlenen zaman aralığının dışında kullanılması durumunda beyne ek hemorajik bir hasara sebep olabileceği düşünülmektedir. İntravenöz olarak verilen t-PA, plazminojeni, plazmine dönüştürür ve damarın tıkanmasına sebep olan kan pıhtısını çözerek damarın beslediği bölgeye kanlanmanın devam etmesini sağlamaktadır (65). İskemik beyin felcinin akut bir tedavisi olarak t-PA kullanılıyor olsa da ilaç kullanımı ile ilgili süre limitinin olması, çoğu hastada iskemik inmenin ne zaman başladığının bilinmemesi ve doza bağlı gerçekleşebilecek yan etkilerinin mevcut olmasından dolayı kesin bir tedavi yöntemi olarak kullanılamamaktadır (64).

4.6.2.Hipotermi

Literatürde yapılan çalışmalar hipoterminin beyin felci üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu göstermektedir. İskeminin gerçekleşmesinin ardından hipoterminin apoptozu indükleyen proteinlerin miktarını düşürdüğü belirtilmiştir (66, 67). Aynı zamanda hipoterminin, apoptozu inhibe eden proteinlerin miktarını arttırdığı da bilinmektedir (68). Bunun yanında hipotermi, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz pompasını düzenleyerek, Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} kanalları üzerine etki eder. Böylelikle hücre içersine Ca^{+2} iyonunun girmesi engellenir ve Ca^{+2} bağımlı apoptotik mekanizmaları inhibe edilir (69). Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda ise hipoterminin ROT'ları azalttığı gösterilmiştir (70). Hipotermi, mikrovasküler bazal lamina antijen kaybını engellemekte, iskemi sonrası t-PA'dan kaynaklanan hemorajiyi azaltmakta ve kan beyin bariyerinin stabilitesini arttırmaktadır (71, 72).

4.6.3.Nörogenez

İskemik inmenin ardından gerçekleşen nöron ölümüne bağlı olarak endojen tamir mekanizmaları aktive olmakta ve nörogenez meydana gelmektedir (73, 74). Nörogenez, migrasyon, proliferasyon ve olgun nöronlara farklılaşma süreçleri dahil olmak üzere endojen kaynaklı nöronal öncü kök hücrelerden yeni fonksiyonel nöronların üretilme süreci olarak tanımlanmaktadır. Bunların yanında nörogenezin yaşam boyunca subventriküler zonda ve dentat girusta meydana geldiği ve iskeminin ardından arttığı bilinmektedir (75). Literatürde yapılan çalışmalar, yetişkin insan beynindeki subventriküler zonda nöronal kök öncü hücrelerin olduğunu göstermektedir (76). Ayrıca literatürde yapılan diğer çalışmalarda, iskemik hasar sonrası striatumda nörogenezin meydana geldiği (77) ve nörogenezin başlamasında subventriküler zonda bulunan nöronal kök öncü hücrelerin görev aldığı bilinmektedir (78). Subventriküler zon kemirgenler için nöroblastların ana kaynağı olarak bilinmektedir (79). İskemik inme ile gerçekleşen nörogenezin inflamasyon mekanizmasının karmaşık olduğunun bilinmesine rağmen yeni oluşan nöronal hücrelerin migrasyonu için mikroglialar tarafından desteklendiği düşünülmektedir (80). Mikrogliaların bu modülasyon özelliklerini kaybetmesi nöronal kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini git gide yitirmesi anlamına gelmektedir (81). Nöroblastlar, belirli migrasyon davranış biçimleri sergileyerek, SVZ'den

ipsilateral striatuma doğru bölünmekte ve hasara doğru ilerlemektedirler. Nöronal kök öncü hücrelerin hasarın olduğu ipsilateral striatumdaki hasarlı nöronların yenilenmesini ve yeni nöronların oluşmasını teşvik ettiği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (82).

4.6.4. Anjiyogenez

Anjiyogenez, mevcut damarlardan yeni mikro damarların meydana gelmesi anlamına gelmektedir (83). Anjiyogenez, iskeminin meydana gelmesinden 4. gün ile 7. gün arasında ortaya çıkmaktadır (84). İskemik hasar sonrası, iskemiden etkilenen bölgeye giden kan akımının artmasını ve metabolik besin maddelerinin ulaştırılmasını sağlamak amacıyla anjiyogeneze ihtiyaç duyulabilmektedir (85). Literatürde yapılan çalışmalar anjiyogenezin aksonal uzama, nörogenez, nöronal öncü kök hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu tetiklemek koşulu ile fonksiyonel geri kazanımlara katkı sağladığını göstermektedir (86). Vasküler endotelial büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- β , anjiyopoetin-1 gibi proteinler nörovasküler birimlerden oluşan hücreler arası etkileşimlerin gerçekleşmesine katkıda bulunarak anjiyogenezi desteklemektedir (87). Nörovasküler birimler, nöron ve diğer hücrelere oksijen ve besin sağlayan nöron, akson, glia ve mikro damarların oluşturdukları çevre olarak tanımlanmaktadır (88).

Nöronal kök hücrelerin proliferasyonunun gerçekleşmesiyle birlikte, nöroblastlar subventriküler zondan peri-enfarktüs bölgeye göç ederek anjiyogenezi başlatmaktadır (83). Mikrodamarlar, nöronal kök hücreler için mikro ortam yaratarak oksijen, besin maddeleri ve çözümlü faktörler salgılayarak nöronal kök hücrelerin vasküler güdümlü olarak göçlerini teşvik etmektedirler (89). Anjiyogenez, aksonal büyümeyi tetiklemek için uygun ortam sağlamak ve nörogenezi indüklemektedir. Böylelikle, anjiyogenez ve aksonal büyümeyi teşvik eden ajanların kullanılması iskemik bölge için terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilebilmektedir (90).

4.6.5. Gliogenez

Hasar meydana geldiğinde, hasardan etkilenen alanda aktif hale gelen astrositlerin miktarlarının arttığı bilinmektedir. Aktif hale gelmiş olan astrositler,

aksonal uzamayı engellemektedirler (91). Hasar sonucu oluşan yeni astrositler, mevcut olan yerleşik astrositlerden türeyebileceği gibi aynı zamanda nöronal öncü kök hücrelerden de meydana gelebilmektedirler (92). Beyin plastisitesi, beyinin hem içeriden hem dışarıdan gelen uyarılara ve yaralanmalara karşı kendisini yeniden organize edebilme becerisidir. Beyin plastisitesinde, astrositler, mikroglyalar ve kan vasküler hücreleri yer almaktadırlar (93).

4.7.Hamilelik

Hamilelik ve doğum sonrası dönem, hormonal değişimleri de içeren fizyolojik değişimler ile karakterize edilmektedir. Bu hormonal değişimler hamileliğin korunması için hayati önem taşımakta ve ayrıca diğer nöroendokrin olaylar ile birlikte hamileliğin korunmasını da sağlamaktadır (10, 94). Bu şekilde gerçekleşen hormonal değişimlerin plasentanın gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (11). Hipotalamus, hipofiz bezi ve plasenta çok sayıda hormon üreterek hamilelikteki endokrin sürecine katkı sağlamaktadır. Hamilelik sırasında birçok hormon seviyesinde değişim meydana gelmektedir (95).

4.7.1.Hamilelikte Meydana Gelen Hormonal Değişikler ve Beyin Hasarı Üzerine Etkileri

Östrojen ve progesteron seviyeleri hamilelik sırasında artmakta, son trimesterde zirveye ulaşmakta ve doğumdan hemen sonra bu hormonların seviyelerinde düşüş meydana gelmektedir (96). Östrojenler kana salındığında östrojen reseptörlerini eksprese eden hücreler tarafından tanınmaktadır. Endotel, epitel, kas, hematopoietik hücreler, nöron ve glia gibi birçok hücre östrojen reseptörüne sahiptir. Ayrıca östrojenler parakrin ve otkrin sistemlerde de görev almaktadırlar (97). Östrojen, vasküler fonksiyonları, inflamatuvar yanıtları, metabolizma, insülin duyarlılığı, mitokondriyal fonksiyonları ve hipertrofi gelişimini kontrol etmektedir. Seks steroid hormonları, özellikle de östrojenler merkezi sinir sisteminde görev alan tanımlanmış nöroprotektif ajanlardır. Östrojenlerin, travmatik beyin hasarı, iskemi gibi durumlarda hasar sonrasında iyileştirici mekanizmaları aktive ettikleri bilinmektedir (98, 99). Aynı zamanda östrojen miktarında meydana gelen artış, hasar sonrası glutamat eksitotoksitesini ve radikal oksijen türlerinin miktarını azaltmaktadır (100).

Progesteron, vazodilatasyona sebep olmaktadır. Bununla birlikte progesteron PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek eNOS'un fosforile olmasını sağlamaktadır. Bu sayede eNOS nöroprotektif olarak sistemde yer almaktadır (101-103). Progesteron, kan beyin bariyerini geçerek hasarlı beyin dokusu üzerinde nöroprotektif olarak görev almaktadır (104).

Prolaktin ön hipofiz bezinden salgılanmakta ve emme refleksini tetiklemek amacıyla üretilmektedir. Hamilelik sırasında prolaktin miktarı arttığı bilinmektedir. Hamileliğin son evrelerinde ise bu artış oranı 10 ila 20 kat arası değişmektedir (105). Hamileliğin ardından emzirme işlemleri gerçekleşmediği takdirde prolaktin seviyelerinde 1 ila 2 hafta içerisinde düşüş meydana gelmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda prolaktinin hamilelik esnasındaki artışının sebebi estradiol seviyelerinin artması olduğu düşünölmektedir (106).

4.7.2.Hamilelik ve Nörodejeneratif Hastalıklar

4.7.2.1.Multiple Skleroz (MS)

Multiple sklerozis (MS) hastalığından muzdarip olan kadınlar doğum yapmaktan kaçınmaktadır (12). MS hastalarının kullanmaları gereken ilaçların fetüs için zararlı olduğu düşünölse de yapılan çalışmalarda hamilelikte kullanılan ilaçların bebek için risk oluşturmadığı düşünölmektedir. Hamileliğin üçüncü trimesterinde MS ile ilgili semptomların %70'e kadar azaldığı görölmektedir (13).

4.7.2.2.Alzheimer Hastalığı

Kadınların Alzheimer hastalığına yakalanma ihtimalinin erkeklere göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni olarak ise kadınların erkeklere göre daha uzun yaşamaları gösterilmektedir. Kadın ve erkek yaşamına bakıldığında erkeklerin, Alzheimer hastalığına yakalanmadan önce, çoğunlukla kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle hayatlarını kaybettikleri bilinmektedir (14). Tüm bunların yanında östrojen hormonunun da Alzheimer hastalığında önemli bir rolü olduğu düşünölmektedir (15). Östrojen miktarının menopoz ile azalmasına bağlı olarak kadınların Alzheimer hastalığına yakalanma risklerinin arttığı bilinmektedir (16). Literatürde yapılan çalışmalarda ile hamileliğin Alzheimer hastalığına iyi geldiği gösterilmektedir.

Hamileliğin Alzheimer hastalığı üzerinde koruyucu etkisinin olmasının yanında birden fazla çocuk sahibi olan kadınların tek çocuk sahibi olan kadınlara kıyasla Alzheimer hastalığına yakalanma riskinin %12 oranında daha az olduğu belirtilmektedir (107). Gebelikle birlikte belirli hormonların değişmesi de Alzheimer'ı tetikleyebilmektedir (108). Östrojenler nöroprotektif olarak tanımlanmaktadır ve amiloid beta plaklarının sentezini engelleyerek (109) nöronal sağ kalım yollarını aktive etmektedir. Böylelikle Alzheimer'ın ortaya çıkışı da engellenmektedir (110-113).

Hamilelikte diğer önemli bir hormon olan prolaktin ise Alzheimer üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir ve emziren annelerin emzirmeyen annelere kıyasla bu hastalığa yakalanma risklerinin daha az olduğu belirtilmektedir(17). Çünkü prolaktin GSK3β'yi inhibe ederek (114) Alzheimer'a sebep olan tau proteininin birikimini engellemektedir (115).

4.7.2.3.Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığının hamilelik yaşlarında ortaya çıkması genellikle nadirdir. Bu hastalık çoğunlukla hamileliğin yaşandığı yaşların daha ileriki dönemlerinde ortaya çıkmaktadır (116). Literatürde yapılan çalışmalar hamilelik boyunca Parkinson semptomlarının azaldığını gösterse de yapılan diğer çalışmalarda hamilelik sonrası Parkinson semptomlarının kötüleştiği gösterilmektedir (117). 1998 yılında Hargell ve arkadaşlarının 64 hamile kadın üzerinde yaptığı araştırmalar değerlendirildiğinde 31 hamile kadında Parkinson hastalığının %48 oranında kötüleştiği, 33 hamile kadında Parkinson hastalığının semptomlarının %58 iyileştiği gösterilmiştir. Buradan yola çıkılarak Parkinson hastalığı sırasında yaş ile birlikte birçok parametrenin olduğu düşünülmektedir (116).

4.7.3.Hamilelikte İskemik Hasar

Fizyolojik koşullarda, doğum yaşı aralığı olarak kabul edilen yaş aralığında kadınlarda iskemi nadir görülmekte olan bir hastalıktır (118-120). Literatürde yapılan çalışmalara göre, lohusalık döneminde hemorajik iskemi ve normal iskeminin meydana gelebilme oranlarında artış olduğu gösterilmektedir. Bunun yanında hamilelik sırasında hemorajik iskemi riskinde küçük bir artış görülürken, normal

iskeminin gerçekleşme ihtimalindeki değişim net olarak gösterilememektedir. Yapılan çalışmalarla elde edilen verilere göre hamilelik sırasında beyin felci gerçekleşme ihtimali artmamış olsa da doğumdan sonraki dönemde beyin felci riskinin arttığı görülmektedir (9).

Gebelik de dahil olmak üzere, kadınlarda cinsiyete özgü çeşitli faktörlerin inme riskini artırdığı bilinmektedir (118-120). Peripartum yani doğum öncesi dönemde, meydana gelen hassaslık, kardiyovasküler problemlerin olması, kan damarı anamolilikleri, kanın pıhtılaşma bozuklukları, gebelik sırasında gelişen hipertansiyon ve preeklampsi doğum sırasında inme riskini artırabilmektedir. Yakın tarihte yapılan bir çalışmada, 100.000 hamileliğin yalnızca 30 tanesinde iskeminin meydana geldiği bilinmektedir. Aynı zamanda bu hamileliklerde iskeminin ilk 12 hafta içerisinde, üçüncü trimesterde ya da erken doğum sırasında meydana geldiği gösterilmektedir (121). Hamilelik sırasında meydana gelen iskemi nedeniyle, annelerin %15'i hayatını kaybetmektedir (122). Hamilelikte iskeminin meydana gelmesiyle ölümle sonuçlanmayan vakaların ise çoğunda, konuşma, yorgunluk, hareketlilik kaybı ve bilişsel bozukluklar meydana gelmektedir (123). Annede meydana gelen iskemi, fetal ve neonatal sağlığını etkilemektedir (124). Bu konu ile ilgili araştırmaların hala devam etmesine rağmen sıçanlarda yapılan çalışmalar, annede gebelik sırasında meydana gelen global serebral iskeminin, gebelikte nöronal hasarı arttırdığı görülmektedir (125).

4.7.4.Hamilelikte İskemi ile İlgili Fizyolojik Süreçler

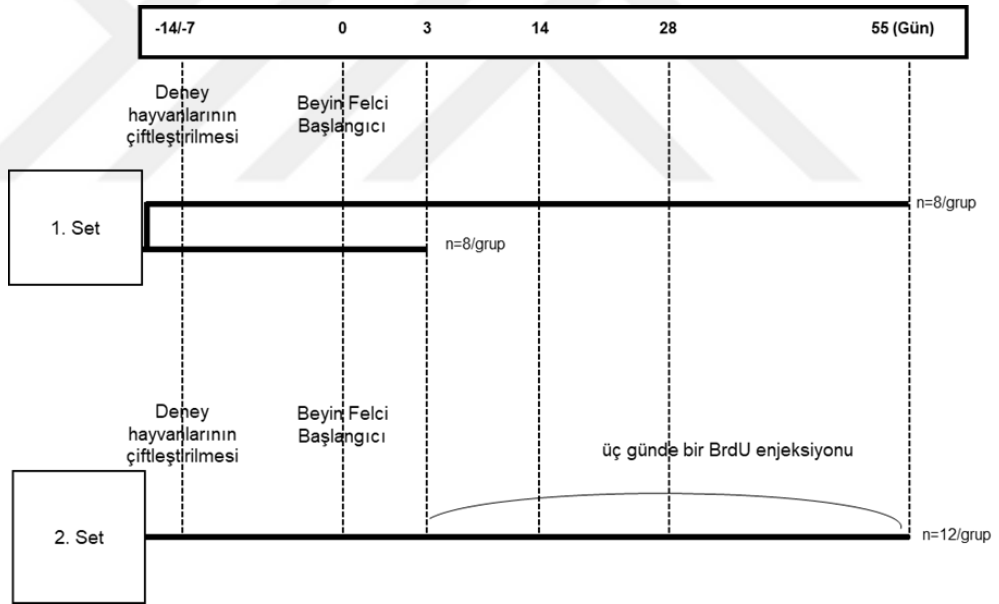
Hamilelik ve lohusalık döneminde beyin hemodinamiğinde bazı fizyolojik değişimler meydana gelmektedir. Hamilelik sırasında renin miktarının artışı su ve sodyumun tutulması ile ilişkilendirilmektedir. Meydana gelen bu sodyum artışı, kardiyak debisinde, infarkt volümde ve kalp hızında artışa sebep olmaktadır. Bozulan bu hemodinamik yapı ise hipertansiyon gibi sorunları meydana getirmektedir (126). Kan damarlarının iskemi ve hemorajik inme ile arasındaki ilişki net olarak anlaşılamasa da kan damarlarının duvarlarında meydana gelen değişimler özellikle endotel hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasıyla meydana gelen hemorajik iskemiye sebep olmaktadır (127). Bu sebeple hamilelik sırasında meydana gelen hormonal değişimler, iskemiye karşı anneyi korumaktadır (128, 129).

Bunlara ek olarak hamilelik sırasında vücut ısısının düştüğü bilinmektedir (130). İskemik hasarın tedavi edilmesi için kullanılan yöntemlerden birinin hipotermi olduğu da bilinmekte ve hamilelik sayesinde gerçekleşen vücut ısısının düşmesi iskemi için nöroprotektif bir etki göstermektedir (131, 132). Erken yaşlarda meydana gelen doğumlarda iskemik inme riskinin az olduğu belirtilirken, ileriki yaşlarda meydana gelen hamileliklerde iskemik inme riskinin yaşa bağlı arttığı görülmektedir (133-135). Literatürde yapılan çalışmalarda hamileliğin ve doğum yapmanın iskemi üzerindeki etkilerinin farklı olabileceği düşünülmektedir (136). Sıçanlarda, hamileliğin iskemi üzerinde negatif etkileri olduğu düşünülse de fareler üzerinde yapılan son çalışmalar hamileliğin ve doğum yapmanın, iskemi üzerinde iyileştirici etkilerinin olduğunu göstermektedir (137). Ritzel ve ark. paritenin (doğum sayısı) kısa ve uzun dönemde iskemi üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunu göstermektedir (8). Bunun yanında birden fazla çiftleştirilmiş farelerde, hiç çiftleşme deneyimi olmayan farelere kıyasla, iskemi sonrası beyindeki enfarkt hacmin daha küçük olduğu, astrosit ve mikroglia sayısının daha az olduğu, IL-6 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ve CCL-2 gibi kemokinlerin sayısında azalma meydana geldiği ve büyüme faktörlerinin (bFGF, VEGF) sayılarında ise artış olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, iskemi geçirmiş ve birden fazla çiftleşme deneyimi olan farelerde, iskemi geçirmiş ve çiftleşme deneyimi olmayan farelere kıyasla anjiyogenezisin daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalara ek olarak ise inme sonrası birden fazla çiftleşme deneyimine sahip sıçanlarla, hiç çiftleşme deneyimi olmayan sıçanların aldıkları ilk hasarın eşit olduğu bilinse de, eksitotoksisitenin birden fazla çiftleşme deneyimi olan sıçanlarda daha fazla iyileştirme gösterdiği bilinmektedir (138). Bu sebeple daha önce hiç çiftleşme deneyimine sahip olmayan sıçanların iskemiye karşı koruyuculuğunun kısıtlı olduğu sonucuna varılmaktadır. Altta yatan mekanizmalar net olarak anlaşılamamış olsa da bu mekanizmalarda mikrokimerizmin rol oynadığı düşünülmektedir. Hayvan ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar ile mikrokimerik hücrelerin, hasar bölgesine giderek iyileşmeye yardımcı oldukları gösterilmektedir (139, 140). Ritzel ve ark. birden fazla çiftleşme deneyimine sahip farelerde yaptıkları çalışmalar ile, iskemik hasar sonrası, beyin hasarlı alanına fetal hücrelerin göç ettiklerini göstermektedir (8).

5.MATERYAL ve METOT

5.1.Deney Dizaynı ve Deney Grupları

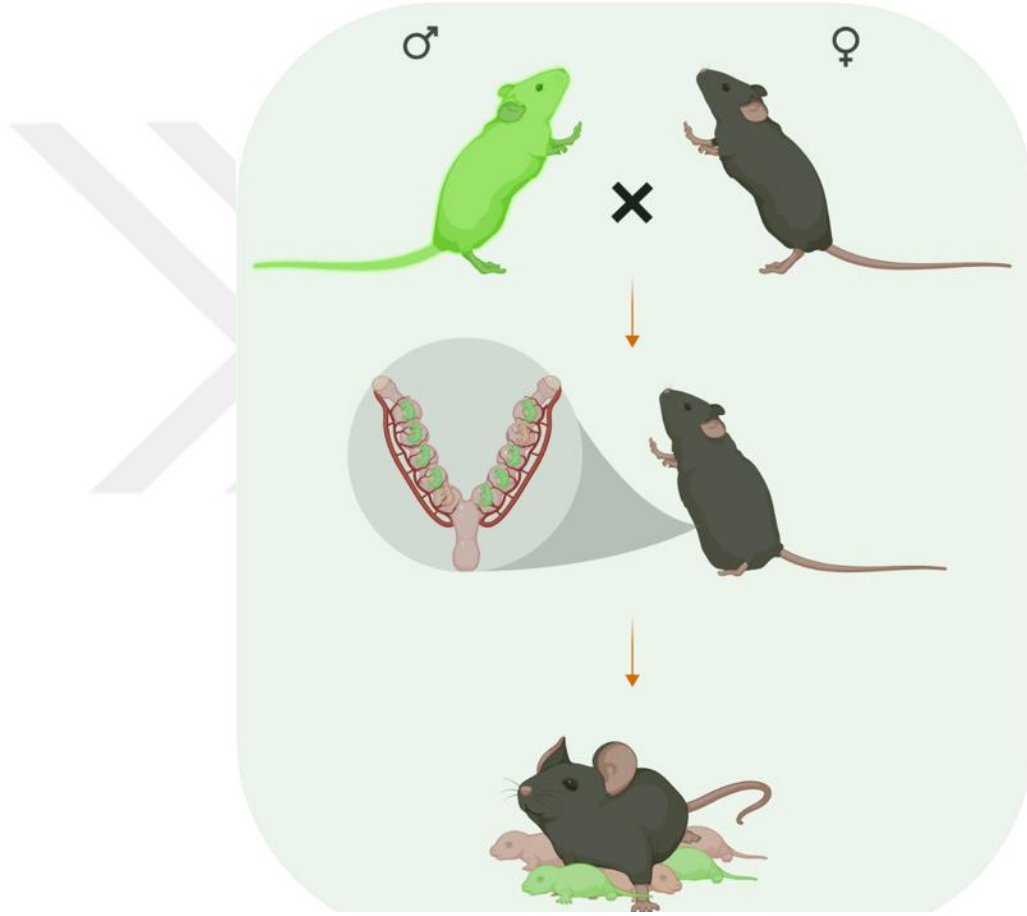
Fareler üzerinde yapılan tüm deneysel müdahaleler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul onayı (28/11/2019) alınarak gerçekleştirilmiştir. Deneyleler gerçekleştirilmeden önce ve deneyleler gerçekleştirildikten sonra fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olan odalarda tutulmuştur. Deney grupları; tüm deneylelerin kontrolü olması amacıyla hamile olmayan ve iskemi indüklenmeyen fareler (kontrol), hamileliğin etkisinin araştırılması amacıyla iskemi indüklenmeyen hamile fare (hamile), iskeminin etkisinin araştırılması için iskemi indüklenen ve hamile olmayan fare (hamile olmayan iskemik), hamileliğin iskemi üzerine etkilerinin araştırılabilmesi için iskemi indüklenen hamile fareler (iskemik hamile) olacak şekilde dizayn edilmiştir (Şekil 5.1.1.).



Şekil 51.1. Deney dizaynı.

5.2.Farelerin Çiftleştirilmesi ve Hamileliğin Takibi

Deney grupları için 8 haftalık tüm hücrelerinde yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonu yapabilen erkek transgenik C57BL6j suşu fare ($C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J$, 003291, Jackson) ile yabancı tip C57BL6j dişi fareler çiftleştirilmiştir ve dişilerin hamileliklerinin takibinin yapılabilmesi amacıyla vajinal plak takibi gerçekleştirilmiştir. Hamileliklerinin ikinci trimesterindeki dişi farelere fokal iskemi indüklemek amacıyla intraluminal filament tekniği kullanılmıştır (**Resim 5.2.1.**).



Resim 52.1 Yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonu yapabilen erkek transgenik C57BL6j suşu fare ($C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J$, 003291, Jackson) ile yabancı tip C57BL6j dişi fareler çiftleştirilmesi.

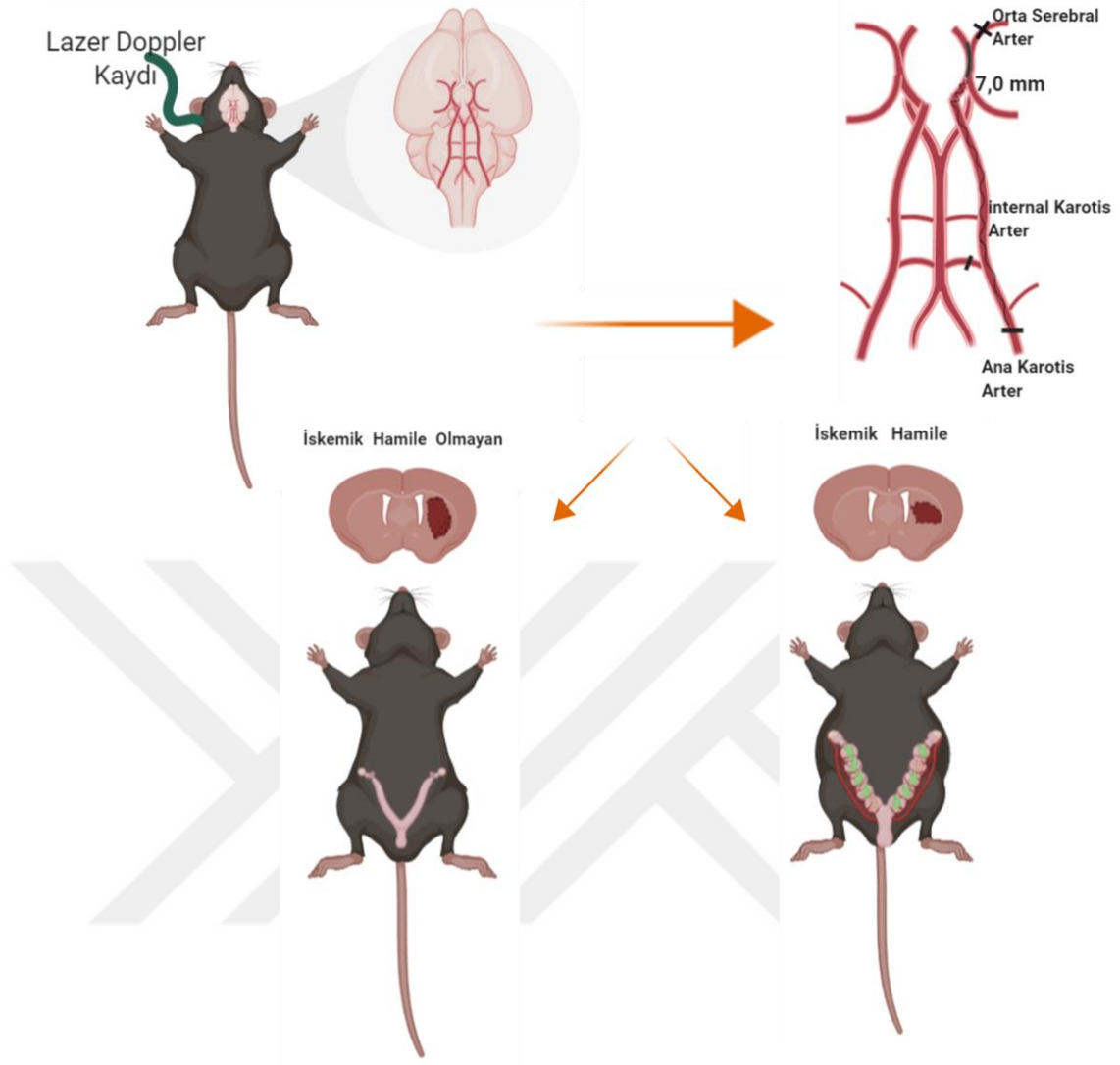
5.3.Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO)

Tüm hücreleri GFP pozitif olan erkek transgenik fareler ile çiftleştirilen yabanıl tip dişi C57BL6j suşu fareler orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyonu gerçekleştirildiği süre boyunca %1'lik izofluran (Ruhsat Numarası: 07.05.2002-112/44, ADEKA) gaz anestezisi altına alınmıştır. Vücut sıcaklıkları 36,5-37,0 °C arasında tutulmuştur. Laser Doppler Flowmetri (Perimed) cihazı oklüzyon ve reperfüzyon boyunca beyinde meydana gelen anlık kan değişim değerlerini ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Cihazın sahip olduğu fiberoptik prob, Bregma'nın -2 mm posterior ve 6 mm lateralı olacak şekilde hasarlı olan hemisferin direkt olarak kafatası kemiği üzerine dental yapıştırıcı yardımı ile sabitlenmiştir. İntraluminal filament tekniği kullanılarak orta serebral arter oklüzyon modeli oluşturulmuştur. Bu teknikte, boyun bölgesine atılan kesi sonrasında, sol karotid arter izole edilmiş ve 6-0 ipek (S1165, Doğsan) ipele ligasyonu yapılmıştır. Damarı geçici olarak tıkmak amacıyla internal karotid arter üzerine mikrovasküler klips yerleştirilmiştir ve sonrasında damar makası ile sol kommon karotid artere kesik atılmıştır. 7-0 kalınlığına sahip olan monofilament (701934PK5Re, Docol) atılan kesikten internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itilmiştir (**Resim 5.4.1.**) (141).

5.4.Laser Doppler Flowmetri

Orta serebral arterin doğru bir şekilde tıkanığının tespit edilebilmesi için kan akımındaki düşüşten faydalanılmıştır. Laser doppler flowmetri cihazı yardımı ile kan akımındaki değişiklikler anlık olarak takip edilmiştir. Kan akımındaki düşüş ile orta serebral arterin doğru olarak tıkanığın teyit edilmiştir. Oklüzyondan 30 dakika sonra internal karotid arterden içeri itilen monofilament geri çekilmiş ve reperfüzyon aşamasının takip edilebilmesi amacıyla kan akımı değerleri 20 dakika daha laser doppler flowmetri cihazı ile takip edilmiştir (**Resim 5.4.1.**) (141, 142).

Uzun dönem deney setine dahil olan fareler deneylerinin sona erdiği 42. günün sonunda anestezisi altına alınmış ve aksonal projeksiyon ile ilgili izleyicilerin uygulanması amacıyla motor korteks bölgelerine Biyotinlenmiş Dekstran Amin (BDA) enjeksiyonu yapılmıştır. Diğer deney grupları için iskemi sonrası deney dizaynında belirtilen sürelerde deney grupları sonlandırılmıştır (143).



Resim 54.1. Hamile olan ve hamile olmayan farelere orta serebral arter oklüzyon modelinin uygulanması.

5.5. Deneyin Sonlandırılması ve Beyinden Örnek Alınması

İmmüno Floresan çalışmalar için dizayn edilen her deney grubundan 6 fareye iskemi indüksiyonundan 55 gün sonra %0,9 NaCl transkardiyak perfüzyon uygulanmıştır. Deneyi sonlandırmak amacıyla fareler, derin anestezi altında dekapite edilip beyinleri disekte edilmiştir. Disekte edilen beyinler, kuru buz üzerine alınmış ve hızla dondurulmuştur. Rutin immünohistokimyasal analizler için kryostat cihazı kullanılarak bregma 0.0 seviyesinden (plastisitenin değerlendirilebilmesi için ise fasiyel nükleus seviyesinden) 18 µm'lik koronal kesitler alınmıştır. Alınan kesitler -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.6.İmmünohistokimyasal Analizler

Her bir boyama için tüm gruplardaki her bir fareden kesitler alınmış ve immünohistokimya yöntemi ile boyanmıştır. Boyamanın yapılabilmesi amacıyla -80°C'den çıkarılan kesitler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından %4'lük paraformaldehit (PFA) (158127, Sigma Aldrich) solüsyonunda 7 dakika bekletilen kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde yıkanmıştır. Daha sonra kesitler, oda sıcaklığında NGS ve %0,3'lük PBS-T ile 1 saat boyunca humidified çember içerisinde ve çalkalayıcı üzerinde bloklanmıştır. Kesitler bloğun ardından uygun primer antikor ile +4°C'de gece boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün sabah, kesitler PBS ile yıkanıp uygun sekonder antikorlar eklenmiş ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kesitler PBS ile yıkanmıştır. Hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi amacıyla 4',6-diamidino-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI, D9542, Sigma Aldrich) boyaması yapılmıştır (**Tablo 1.**). Boyama tamamlandıktan sonra kesitlerin üzeri uygun kapatma solüsyonu (Fluoromount, F4680, Sigma Aldrich) ile ve lamel yardımı ile kapatılmıştır. Kesitler lazer taramalı konfokal mikroskop yardımı (LSM800, Zeiss) ile görüntülenmiştir. Görüntülenmiş olan kesitler, gerekli analizlerin yapılabilmesi amacıyla konfokal mikroskop kullanılarak fotoğraflanmıştır. Analizlerin yapılabilmesi için beyinde striatum bölgesinden 12 alan, hem ipsilateral hem de kontralateral bölgede benzer yerlere gelecek şekilde belirlenmiş ve boyamanın pozitif olduğu hücreler sayılıp her grup için ortalama olan değerler saptanmıştır.

5.6.1.NeuN ile Nöronal Sağkalımının Belirlenmesi

30 dakika iskemi ve 3 gün reperfüzyon geçiren farelerde nöronal sağkalımın değerlendirilmesi amacı ile NeuN (dilüsyon oranı 1:100, MAB377C7, Merck) boyaması yapılmıştır. İmmünohistokimyasal boyama protokolünden farklı olarak NeuN konjuge olarak kullanılmış ve blok aşamasından sonra oda sıcaklığında üç saat çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından daha önce belirtilen protokolün devamı uygulanmıştır. Konfokal mikroskopta kesitlerin fotoğrafları çekilerek mikroskobun kendi programı olan Zen Blue programında hücreler sayılmış ve kontrol grubuna göre nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (143, 144).

5.6.2. Glial Yaranın Değerlendirilmesi

Glial yaranın değerlendirilmesi amacıyla 30 dakika iskemi geçirmiş ve 55 gün reperfüzyona maruz bırakılmış farelerin beyinlerinden elde edilen kesitlere GFAP (dilüsyon oranı 1:100, 3656, Cell Signaling Technologies) boyaması yapılmıştır. GFAP, NeuN gibi konjuge olup aynı protokol izlenmiştir. Ardından konfokal mikroskobu ile kesitlerin fotoğrafları çekilmiş, hasarlı hemisferdeki glial yara alanı Zen Blue programı kullanılarak ölçülmüştür. Her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır.

5.6.3. DNA Kırıklarının *in situ* Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile Belirlenmesi

İmmünohistokimyasal çalışmalar için alınan kesitlerde DNA kırıklarının *in situ* olarak belirlenmesi ve hücre ölümünün zamana bağlı olarak değerlendirilmesi amacıyla TUNEL kiti (11684795910, Roche) kullanılarak apoptotik hücreler belirlenmiştir. 30 dakika iskemi geçirmiş ve 3 gün reperfüzyona maruz bırakılmış farelerin beyinlerinden elde edilen kesitlere TUNEL boyaması yapılmıştır. İlk olarak -80°C'den çıkarılan kesitler, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından kuruyan kesitler %4'lük PFA solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika ve daha sonra +4°C'de 10 dakika daha olacak şekilde inkübe edilmiştir. 20 dakikalık fiksasyon sonucunda kesitler PBS çözeltisinde yıkanmıştır. Ardından kesitler buz üzerinde 2 dakika boyunca Triton-X-100 (X100, Sigma Aldrich) deterjanı ve tri-sodyumsitrat di-hidrat (A0531948329, Millipore) içeren solüsyonda membran geçirgenliğini artırmak amacıyla bekletilmiştir. Ardından 1 dakika boyunca 750 Watt mikrodalga içerisinde tri-sodyumsitrat di-hidrat pH 6,0 olan solüsyon içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemlerin ardından kesitler PBS çözeltisi içerisinde yıkanmıştır. Kesitler uygun bloklama solüsyonu ile 30 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bloklanmıştır. Ardından enzim substrat içeren TUNEL karışımı kesitlere ilave edilmiş ve kesitler 70 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Yetmiş dakikalık inkübasyonun sonunda kesitler PBS çözeltisi içerisinde yıkanmıştır. Ardından hücre çekirdeğini görüntüleyebilmek amacı ile kesitler 3 dakika DAPI ile muamele edilmiştir. Ardından kesitler PBS çözeltisi içerisinde yıkanmış ve uygun kapama solüsyonu ve lamel yardımı ile kapatılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için kesitlerin iskemik striatum bölgelerinden rastgele 62.500

μm^2 'lik 12 alan belirlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflarda TUNEL (+) hücreler sayılmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır (141).

5.7. Post-iskemik Atrofinin Belirlenmesi

Uzun dönemde korpus kallozum ve striatum bölgesinde meydana gelen atrofinin tespit edilmesi amacıyla 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin kesitlerine *Cresyl violet* boyaması yapılmıştır. -80°C 'den çıkarılan ve bregma seviyesinden alınan kesitler 30 dakika boyunca oda koşullarında kurutulmuştur. Ardından 15 dakika boyunca %4'lük PFA solüsyonunda bekletilmiştir. PFA ile fiksasyonu sonrasında kesitler PBS çözeltisi içerisinde yıkanmıştır. Daha sonra kesitlere 2 dakika masa üzerinde ve ardından 13 dakika çalkalayıcı üzerinde *Cresyl violet* (C5042, Sigma-Aldrich) boyası ile muamele edilmiştir. Kesitler sırasıyla ve her birinde 5'er saniye olacak şekilde %70, %90, %95 ve %100 etanol(100983, Millipore) serisinden geçirilmiştir. Alkol serisinden geçirilen kesitlerdeki boyanın fikse olması için kesitler ksilen solüsyonu içerisine alınmıştır. Kesitler uygun kapatma sıvısı (Entellan, 107961, Millipore) ve lamel yardımı ile kapatılmıştır. Kesitlerin görüntülenebilmesi için ışık mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss) kullanılmıştır. Elde edilen görüntülerden kontralateral striatum, ipsilateral striatum ve korpus kallozum alanları Zen Blue programı kullanılarak ölçülmüştür. İpsilateral striatum alanlarının kontralateral striatum alanlarından çıkarılması ile hasar sonrasında striatum bölgesinde meydana gelen atrofinin hesaplaması yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bu değerlerin kontralaterale göre yüzdeleri hesaplanmıştır (143).

5.8.BrDU ile Hücre Farklılaşmasının Belirlenmesi

İskemi indüklenmesinin ardından yeni oluşan ve farklılaşan hücrelerin takibini gerçekleştirebilmek amacıyla farelere 5-bromo-2'-deoksiüridine (BRDU, B5002, Sigma Aldrich) enjeksiyonu yapılmıştır. Bu enjeksiyon post-op 3. günde başlayıp, üçer gün aralıklarla deney sonlandırılana kadar devam etmiştir. Fizyolojik serum içerisinde çözdürülen BrdU, 100 mg/kg dozunda olacak şekilde farelere verilmiştir. Elli beş günün sonunda yüksek doz anestezi altında, farelere serum fizyolojik ile perfüzyon ve %4'lük PFA ile fiksasyon yapılmıştır. Ardından farelerin beyinleri disekte edilmiş ve disekte edilen beyinler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ek olarak 3 saat daha %4'lük PFA çözeltisinde inkübe

edilmiştir. Son olarak da %30'luk sükröz çözeltisinde çökene kadar +4°C'de bekletilmiştir. Sükröz içerisinde çöken beyinler kuru buz üzerine alınarak dondurulmuştur. Beyinlerden 18 µm kalınlığında kryostat cihazı kullanılarak bregma 0.0 mm seviyesinden koronal kesitler alınmıştır. Diğer immünohistokimyasal boyamalardan farklı olarak BrdU, DNA'nın yapısına katılmaktadır ve bu sebeple 2N HCl kullanılarak DNA'nın parçalanması sağlanmıştır. Elli beş gün setindeki tüm gruplardan, her bir fareden alınan kesitlere ikili boyamalar olan GFAP/BrdU ve NeuN/BrdU boyamalarının yapılabilmesi için kesitler ilk olarak %4'lük PFA ile fikse edilmiş ardından 15 dakika 95°C'deki sodyum sitrat içerisinde kaynatılmıştır. Bu işlemin ardından kesitler 15 dakika oda sıcaklığında aynı çözelti içerisinde soğumaya bırakılmıştır. Kesitler, sitrat ile muamele edildikten sonra PBS çözeltisinde çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Ardından GFAP ve NeuN antikorları ile ayrı ayrı boyamaları yapılmıştır. GFAP ve NeuN boyamalarının yapılmasının ardından BrdU boyamasına geçilmiştir. İkili boyama yapılmış olduğundan GFAP ya da NeuN antikorlarının inkübasyonunun bitmesinin ardından kesitler PBS ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmış ve 37°C' de 1 saat boyunca 2N HCl içerisinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 saat oda sıcaklığında bloklama, 1 saat oda sıcaklığında BrdU primer antikor (dilüsyon oranı 1:100, ab6326, Abcam) ile inkübe edilmiş ardından PBS ile yıkamaları yapılmıştır. Uygun sekonder antikor (goat anti rat, 488 1235966) ile inkübasyonunun ardından tekrar PBS ile yıkamaları yapılmıştır. Daha sonra hücre çekirdeğini görüntülemek amacı ile DAPI boyaması gerçekleştirilmiş ve uygun kapatma solüsyonu ile kesitler kapatılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi amacıyla iskemik hemisferde 24 alan belirlenmiş, fotoğrafları çekilmiş ve NeuN/BrdU ve GFAP/BrdU ikili boyamalarında pozitif olan hücreler Zen Blue programı kullanılarak sayılmış ve her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (143, 145).

5.9.Boyanan Kesitlerin Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi

Boyanan kesitlerin görüntülenebilmesi amacıyla konfokal (LSM800, Zeiss) mikroskobu kullanılmıştır. Mikroskobun sahip olduğu program tarafından kontrol edilen motorize tabla ile x-y-z düzlemlerinde hareketi sağlayarak görüntülerin elde edilmesi sağlanmıştır. Çekirdekler arasındaki fokus farkını en aza indirmek amacıyla z düzleminde farklı fokuslardan görüntüler alınmıştır. Zen Black programı

kullanılarak *maximum intensity projection* (maksimum yoğunluk projeksiyonu) ile farklı fokuslardaki görüntüler birleştirilmiştir. Bu sayede ipsi lateralden programın sahip olduğu *tile* (görüntüleri birleştirme) ve *z stack* (farklı fokuslardaki görüntüleri alabilme) fonksiyonları ile görüntüler alınmıştır.

5.10.Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamının belirlenmesi

Aksonal projeksiyonun değerlendirilmesi amacıyla iskemi sonrası 42. günün sonunda aksonal projeksiyon ile ilgili izleyicilerin uygulanması amacıyla derin anestezi altına alınarak, primer motor korteks bölgelerine (bregma rostral 0.5 mm, lateral 2.5 mm motor korteks bölgesi) Biyotinlenmiş Dekstran Amin (BDA, 10,000 MW, #D1956, Invitrogen)) enjeksiyonu yapılmıştır. BDA enjeksiyonu yapılan farelere 10 gün sonra derin anestezi altında %0,9'lük NaCl ile transkardiyak perfüzyon uygulanmış ve ardından %4'lük PFA ile fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. İşlemin ardından beyinler disekte edilerek +4°C'de 3 saat boyunca %4'lük PFA çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından %30'lük sükröz çözeltisine alınan beyinler çözelti içerisinde çökene kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Çöken beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuş ve kryostat cihazı kullanılarak fasiyel nükleus seviyesinden (Bregma-5.8 ile-6.3 mm arası) 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler immünohistokimya çalışmaları yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. İmmünohistokimya çalışmaları için -80°C'den çıkarılan kesitler, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutmanın ardından kesitler, fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi ile yıkandıktan sonra normal keçi serumu (6903, Sigma-Aldrich) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra, streptavidin bağlanmış AlexaFluor-555 (dilüsyon oranı 1:250, S21381, Invitrogen) ile konjuge edilmiş sekonder antikorla oda sıcaklığında 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmıştır. Kapatılan kesitler Axiozoom (Zeiss) floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Değerlendirme için, iki hemisfer arasında bulunan orta hattan sanal bir çizgi çekilmiş ve bu sanal çizgiyi geçen BDA ile işaretlenmiş aksonlar sayılarak her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (143).

Tablo 1. Antikorlar ve Dilüsyon Oranları.

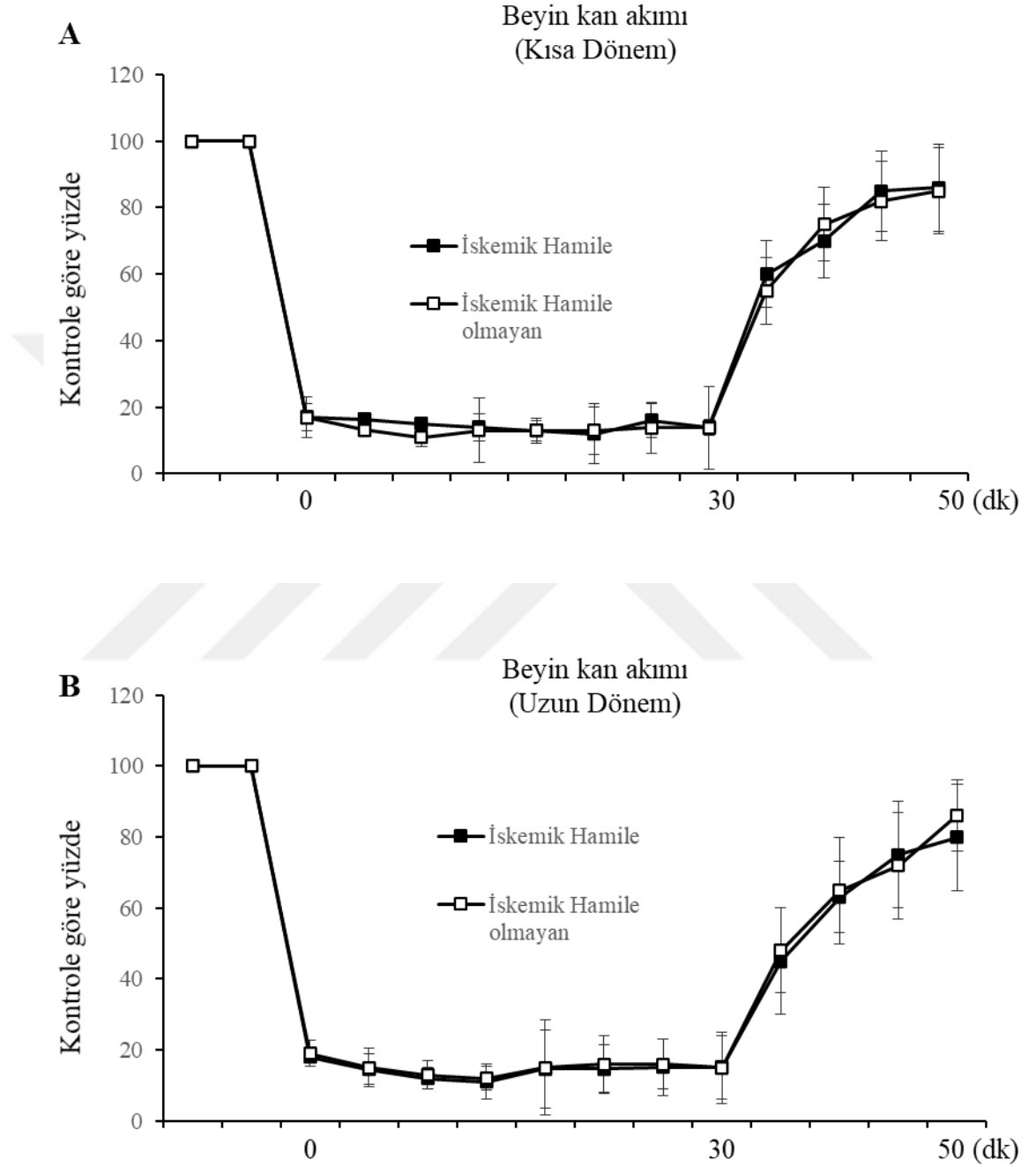
Marka	Katalog Numarası	Antikor	Dilüsyon Oranı
Merck	MAB377C7	NeuN	1:100
Cell Signaling	3656	GFAP	1:100
Abcam	Ab6326	BrdU	1:100
Invitrogen	S21381	Alexa-Fluor 555	1:250

5.11.İstatistik

Grupların arasında bulunan farklılıkların değerlendirilebilmesi amacıyla SPSS programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar *bağımsız (student) t testi* ile analiz edilmiştir. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ ve ** $p < 0.01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1.Serebral Kan Akımının Ölçülmesi

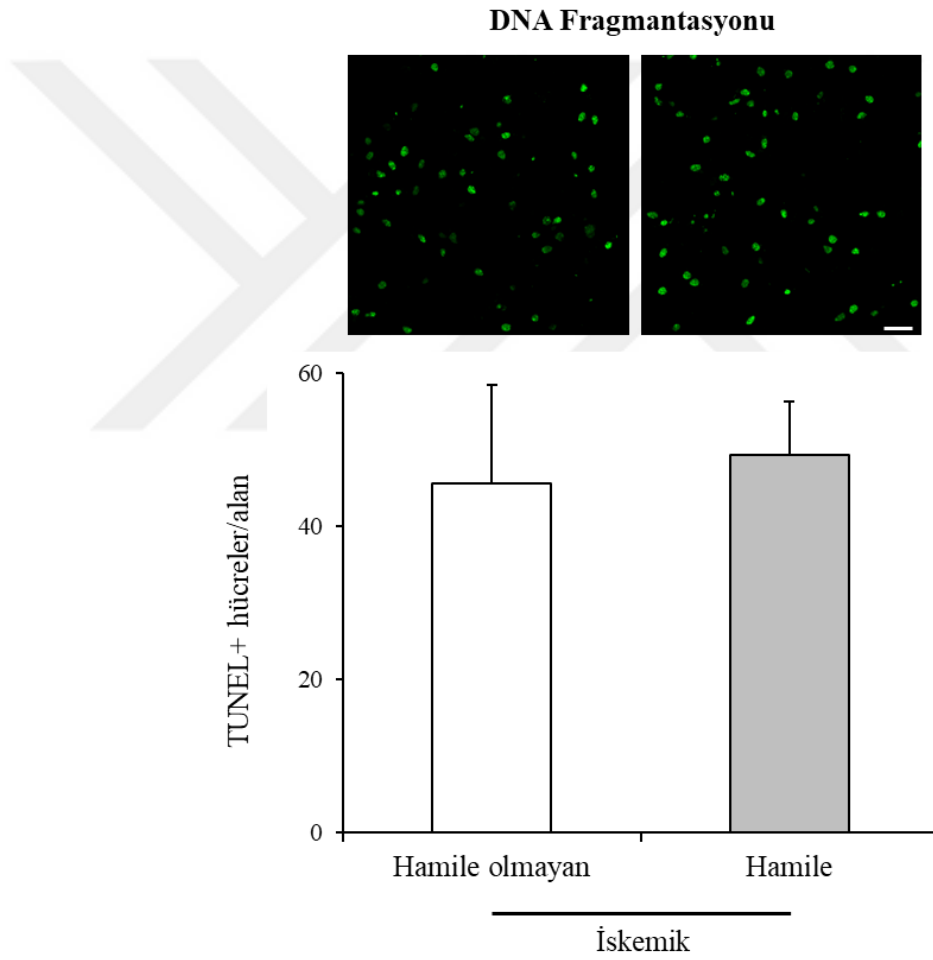


Şekil 61.1. Kısa dönem için Lazer Doppler beyin kan akım kayıtları.

Deneyel olarak iskeminin indüklenmesi ve hasar sırasındaki sürelerin kontrolünü sağlamak ve reperfüzyon aşamasında farelerin serebral kan akımlarının ölçülüp değerlendirilebilmesi amacıyla farelerin kan akımları Lazer Doppler cihazı ile

ölçülmüştür. Kısa dönem seti için iskemi indüklenmeden 15 dakika önce ölçümler alınmaya başlanmıştır. İskeminin indüklendiği 30 dakika boyunca devam eden ölçümler, reperfüzyon aşamasında 20 dakika daha devam etmiştir. Orta serebral arter girişinin başarılı bir şekilde tıkanması sonucu beyin kan akımı %20'nin altına düşmüştür (Şekil 6.1.1.). Bu sonuçlar iskeminin başarıyla indüklendiğini göstermektedir. Reperfüzyon aşamasındaki kanlanma değerlendirildiğinde gruplar arasında serebral kan akımında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir.

6.2. Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi

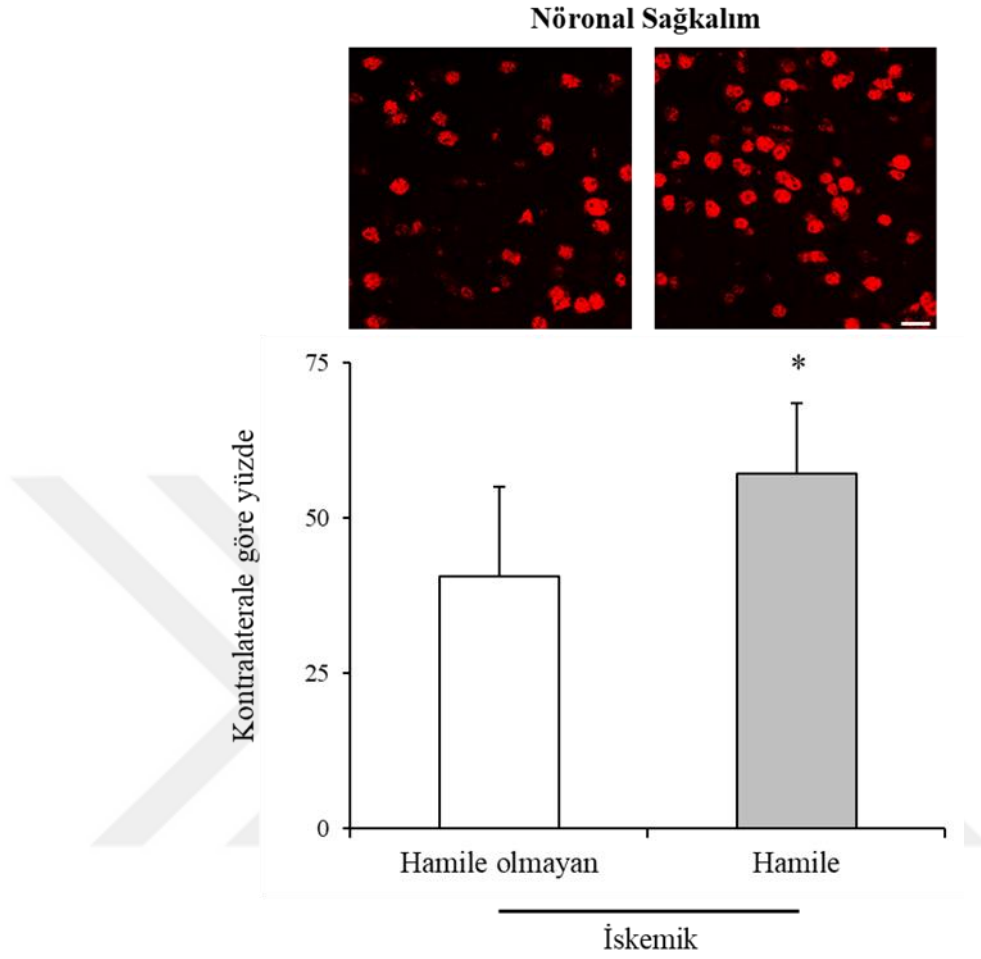


Şekil 62.1. İskemik hasar sonrası apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi.

Temsili TUNEL boyaması ve ikinci trimesterde iskeminin indüklenmesinin ardından 3 gün sonra DNA kırıklarının incelenmesi (Bar 100 µm'yi göstermektedir).

Hamile olan ve hamile olmayan farelere iskemi indüklenmesinin ardından 3 gün sonra meydana gelen DNA kırıklarının değerlendirilmesi amacı ile alınan kesitler in-sitü hücre ölüm kiti (*in-sitü Cell Death Detection Kit*) ile boyanmıştır. İn-sitü hücre ölüm kiti ile boyanan kesitlerin konfokal mikroskobu (LSM800, ZEISS, Almanya) kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra striatum bölgesindeki 12 farklı alandan TUNEL (+) hücreler sayılmış, grupların ayrı ayrı değerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınmıştır. İskeminin indüklenmesinin ardından 3 gün sonra, hamile olan ve hamile olmayan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (**Şekil 6.2.1.**). Striatumdan ölçülen TUNEL (+) hücrelerin hesaplanan alana göre değerleri iskemik hamile olmayan grupta $46,00 \pm 12,75$ iken, iskemik hamile olan grupta $49,00 \pm 6,99$ olarak bulunmuştur. Elde edilen verilere göre iskemik hamile olmayan ve iskemik hamile olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

6.3.Kısa Dönemde Hasar Sonrası Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi



Şekil 63.1. İskemik hasar sonrası nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.

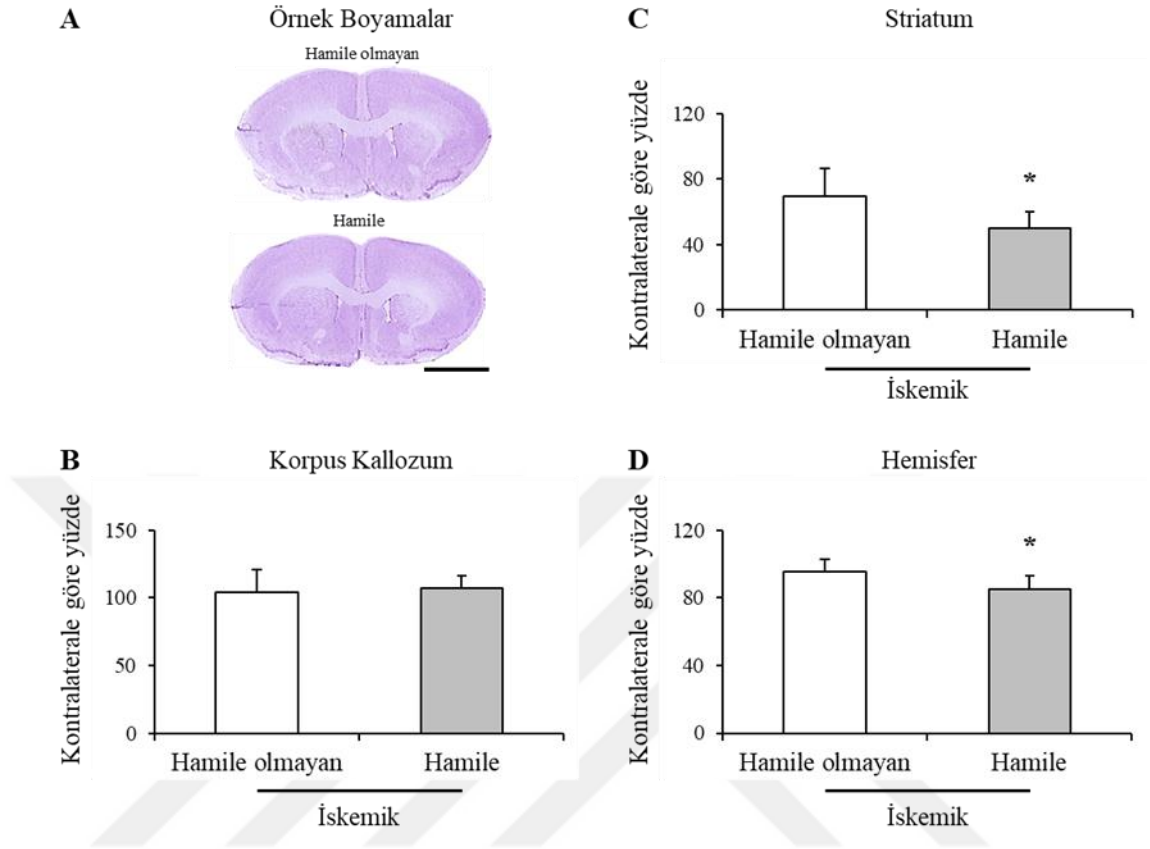
Temsili NeuN (+) boyanması ve gruplar için değerler (Bar 50 μm 'yi göstermektedir.).

Hamile olan ve hamile olmayan iki grup arasında iskeminin indüklenmesinin ardından kısa dönemde nöronal sağkalımı değerlendirmek amacıyla 3 gün kesitlerine NeuN boyaması yapılmıştır. İskemik hamile olan grupta, iskemik hamile olmayan gruba göre iskeminin indüklenmesinden 3 gün sonra nöronal sağkalımda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Kısa dönem kesitlerine NeuN boyaması yapılmış ve konfokal mikroskobu (LSM800, ZEISS, Almanya) ile görüntülenmiştir. Ardından her iki grup için de hasarlı ipsilateral striatumda ve kontralateral striatumda 62.500 μm^2 'lik 12 alan belirlenmiş ve bu alanlarda NeuN (+) hücreler sayılmıştır, iskemik hamile olmayan ve iskemik hamile gruplar için bu alanların ayrı ayrı ortalamaları alınmıştır. İpsilateral hemisferler, grupların kendi kontralateral hemisferlerine göre

değerlendirilmiş olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. İskeminin indüklenmesinin ardından hasardan sonra striatum bölgesinde iskemik hamile olan grupta, iskemik hamile olmayan gruba göre nöronal sağkalımın daha fazla olduğu görülmüştür (**Şekil 6.3.1.**). Striatuma yayılmış olan NeuN (+) hücrelerin iskemik hamile olmayan grupta değeri $41,00 \pm 14,37$ iken iskemik hamile olan gruptaki değeri $57,00 \pm 11,39$ olarak bulunmuştur. Elde edilen verilere göre iskemik hamile olan grupta nöronal sağkalımın, iskemik hamile olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

*İskemik hamile grup ve iskemik hamile olmayan grup arasındaki sonuçlar ortalama \pm SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak p değerinin belirlenmesinde *bağımsız student t testi* kullanılmıştır. İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile olan gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık $*p < 0,05$ olarak ifade edilmiştir.

6.4.İskemi Sonrası Uzun Dönemde Atrofik Alanların Değerlendirilmesi



Şekil 64.1. İskemik hasar sonrası atrofinin cresyl violet boyaması ile değerlendirilmesi.

İskemik hamile ve iskemik hamile olmayan gruplar için örnek boyamalar (A), korpus kallozum (B), striatum (C), ipsilateral hemisferin kontralateral hemisfere göre yüzdeleri (D), göstermektedir. (korpus kallozum için $p=0,699$, striatum için $p=0,016$, hemisfer için $p=0,025$) (Bar 2 mm'yi göstermektedir.).

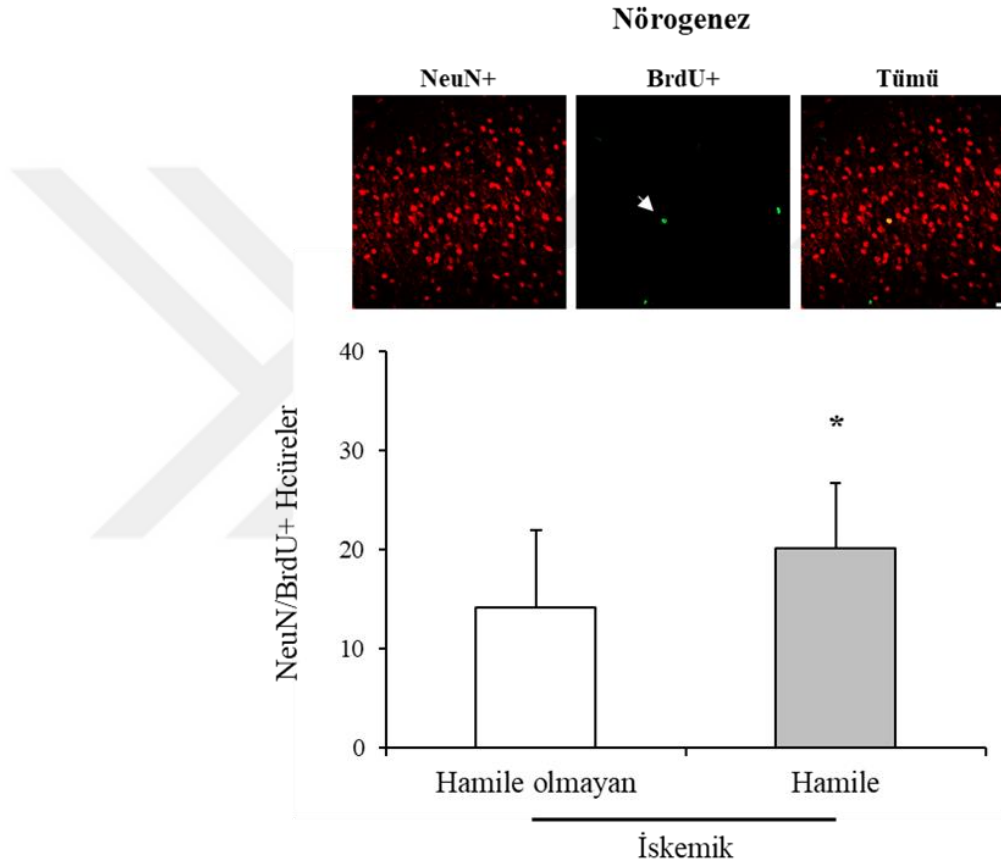
Post-iskemik atrofi alanının değerlendirilebilmesi amacıyla hamile olan ve hamile olmayan deney gruplarına 30 dakika orta serebral arter oklüzyonu yapılmış ardından 55 günlük reperfüzyona bırakılmıştır. Sakrifikasyonları 55. günün sonunda yapılan farelerden elde edilen kesitlere, *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Boyamanın yapılmasının ardından kesitlerin konfokal mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir. Kesitler hasarlı ve hasarsız korpus kallozum, striatum ve hemisfer olmak üzere fotoğraflanmıştır. Ardından korpus kallozum, striatum ve hemisfer alanları Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir grubun korpus kallozum, striatum ve hemisfer alanları ayrı ayrı hesaplanmış ve tüm grupların ayrı ayrı ortalamaları

alınmıştır. Hesaplama, ipsilateral alanlardan ölçülen değerler, kontralateral alanlardan ölçülen değerlerden çıkarılarak yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bu değerlerin kontralaterale göre yüzdeleri hesaplanmıştır. İskemik hamile ve iskemik hamile olmayan grupların 30 dakikalık hasar sonrası atrofik alanları değerlendirilmiş, ipsilateral korpus kallozumun her iki grubunda kontralateral korpus kallozumuna göre hasarlı ve hasarsız alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. İskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan farelerin striatum ve hemisferleri kontralateraline göre değerlendirildiğinde iskemik hamile olan grubun iskemik hamile azaldığı gözlemlenmiştir. İskemik hamile olmayan farelerin kontralateraline göre ipsilateral striatum alanında %31 oranında bir düşüş, ipsilateral hemisferde, kontralateral hemisfere göre ise %5 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. İskemik hamile farelerin kontralateraline göre ipsilateral striatum alanında %51 oranında bir düşüş, ipsilateral hemisferde kontralateral hemisfere göre ise %15'lik bir düşüş gözlemlenmiştir (**Şekil 6.4.1.**).

İpsilateral korpus kallozumun kontralateral korpus kallozuma göre değerlendirilmesi yapılmış ve iskemik hamile olmayan grupta bu değer $104,24 \pm 16,75$ iken iskemik hamile olan grupta $106,93 \pm 9,80$ olarak bulunmuştur. Kontralateral korpus kallozuma göre her iki grubunda ipsilateral korpus kallozumu kıyaslanmış olup, her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (**Şekil 6.4.1.B.**). İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile olan iki grubun ipsilateral striatumu, kontralateral striatumuyla kıyaslanmış olup bu değerler sırasıyla $69,27 \pm 16,95$ ve $49,82 \pm 10,36$ olarak bulunmuştur. Bu değerlendirme sonucu iskemik hamile olan grubun iskemik hamile olmayan gruba göre striatumdaki hasar alanının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.4.1.C.**). Her iki grubun, tüm hemisfer için post-iskemik atrofi alanı değerlendirilmiş olup iskemik hamile olmayan grupta post-iskemik atrofi için olan değeri $95,64 \pm 7,28$ olarak bulunmuş iken iskemik hamile olan grupta bu değer $85,39 \pm 7,89$ olarak bulunmuştur. Bu değerlendirme sonucu iskemik hamile olan grubun, iskemik hamile olmayan gruba göre hemisferler için olan post-iskemik atrofi alanının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.4.1.D.**).

Sonuçlar ortalama (aynı grup içerisinde bulunan farelerden alınan değerlerinin yüzdelерinin ortalamaları) \pm SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel olarak p değeri belirlenmesinde *bağımsız student t testi* kullanılmıştır. İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile grupların arasındaki istatistiksel anlamlılık * $p < 0,05$ olarak ifade edilmiştir.

6.5.İskemik Sonrası Uzun Dönemde Nörogenezin Değerlendirilmesi



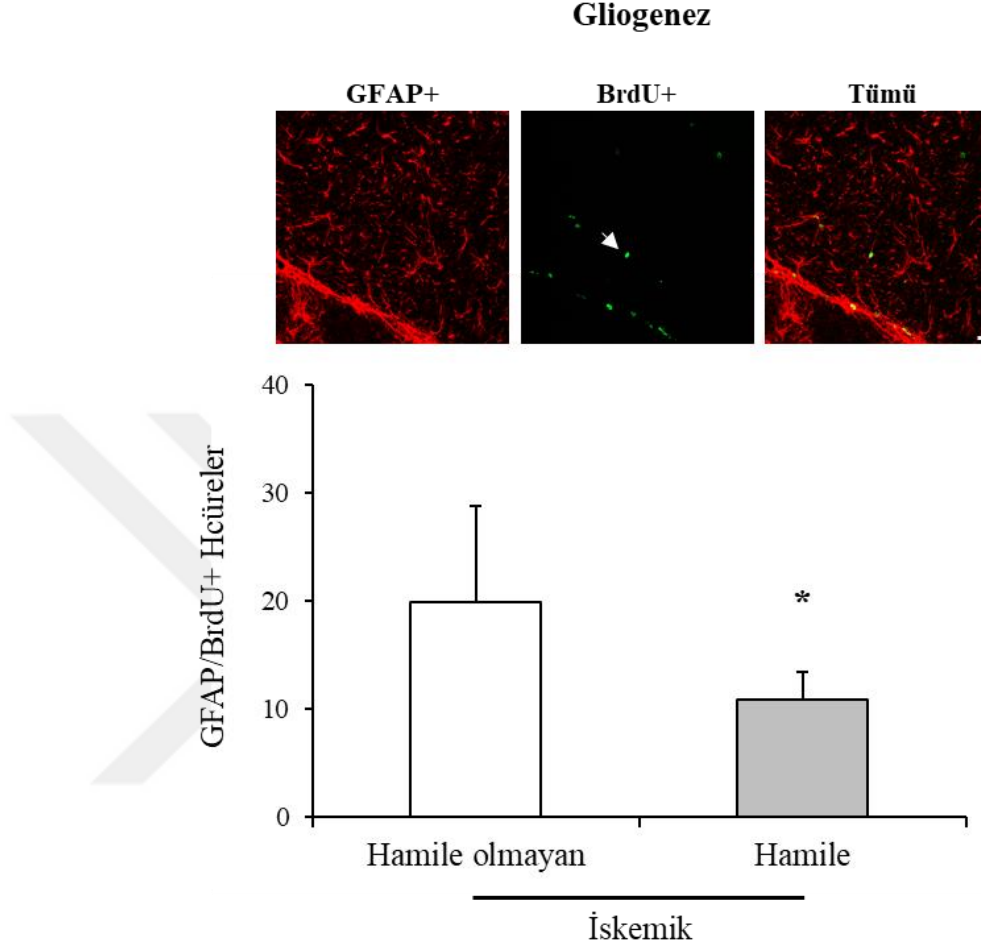
Şekil 65.1 İskemik hasar sonrası yeni oluşan nöronların değerlendirilmesi.

İkinci trimesterde 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra tüm hemisferdeki nörogenez değerlendirilmiştir. Temsili NeuN/BrdU (+) boyanması ve gruplar için değerler (Beyaz ok: NeuN/BrdU (+) hücreyi göstermektedir; bar 20 μ m'yi göstermektedir.).

Nörogenezin değerlendirilmesi amacıyla uzun dönem kesitlerine, NeuN/BrdU ikili boyaması yapılmış ve konfokal mikroskopu (LSM800, ZEISS, Almanya) ile görüntülenmiştir. Ardından her iki grup için de hasarın olduğu ipsilateral hemisferde 62.500 μm^2 'lik 12 alan belirlenmiş ve bu alanlarda NeuN/ BrdU (+) hücreler sayılmış, iskemik hamile ve iskemik hamile olmayan gruplar için bu alanların ayrı ayrı ortalamaları alınmıştır. İskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra iskemik hamile olan grupta, iskemik hamile olmayan gruba göre nörogenezin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek miktarda olduğu görülmüştür (**Şekil 6.5.1**).

Tüm hemisfere yayılmış olan NeuN/BrdU (+) olan hücrelerin ortalaması iskemik hamile olmayan grupta 20,14±6,62 iken iskemik hamile grupta 14,14±7,78 olarak bulunmuştur. Sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel p değerinin belirlenmesinde *bağımsız student t testi* kullanılmıştır. İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile grupların arasındaki istatistiksel anlamlılık *p<0,05 olarak ifade edilmiştir.

6.6.İskeminin İndüklenmesinin Ardından Uzun Dönemde Gliogenez Değerlendirilmesi



Şekil 66.1. İskemik hasar sonrası gliogenezin değerlendirilmesi.

İkinci trimesterde 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra tüm hemisferde gliogenez değerlendirilmiştir (Beyaz ok: GFAP/BrdU (+) hücreyi göstermektedir; bar 20 μm 'yi göstermektedir.).

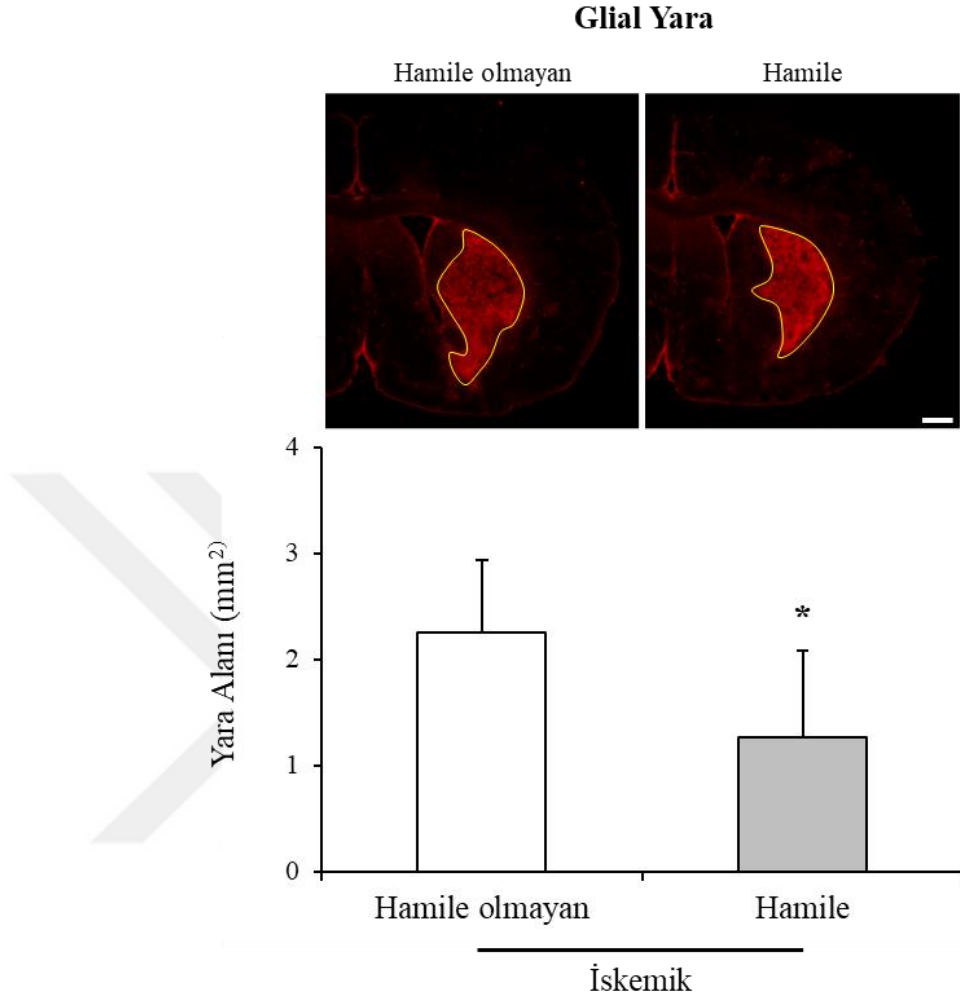
Hamile ve hamile olmayan fareler, 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinden 55 gün sonra derin anestezi altında sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifikasyondan sonra beyinler disekte edilmiş ve kryostat cihazı kullanılarak koronal kesitler alınmıştır. Bu kesitlerdeki gliogenezin değerlendirilmesi amacıyla GFAP ve BrdU ikili boyaması yapılmıştır. Boyamanın yapılmasının ardından konfokal mikroskobunda (LSM800, ZEISS, Almanya) kesitlerin fotoğrafları çekilmiştir. Gliogenezin değerlendirilmesi

için hemisferde rastgele alanlar belirlenmiş ve bu alandaki GFAP/BrdU (+) hücreler sayılmıştır. Hemisferdeki ikili boyamanın pozitif olduğu hücrelerin sayılması amacıyla 62.500 μm^2 'lik 24 alan belirlenmiştir. Bu 24 alan içerisindeki GFAP/BrdU (+) hücreler sayılmıştır. Ardından her bir beyin için ipsilateralde bulunan GFAP/BrdU (+) hücreler sayılmış iskemik hamile ve iskemik hamile olmayan gruplara ait değerler ve ortalamalar ayrı ayrı hesaplanmıştır (**Şekil 6.6.1.**).

İskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan grupların hemisferlerinde bulunan GFAP/BrdU (+) hücreler sayıldığında iskemik hamile olmayan grubun hemisferindeki GFAP/BrdU (+) hücrelerin ortalaması 19,88±8,97 olarak bulunmuş iken iskemik hamile olan grubun hemisferindeki GFAP/BrdU (+) hücrelerin ortalaması 10,86±2,54 olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde iskemik hamile olmayan grupta, iskemik hamile gruba göre gliogenezin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür.

Sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel p değerinin belirlenmesinde *bağımsız student t testi* kullanılmıştır. İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile grupların arasındaki istatistiksel anlamlılık *p<0,05 olarak ifade edilmiştir.

6.7.İskemik Hasarın Ardından Uzun Dönemde Glial Yaranın Değerlendirilmesi



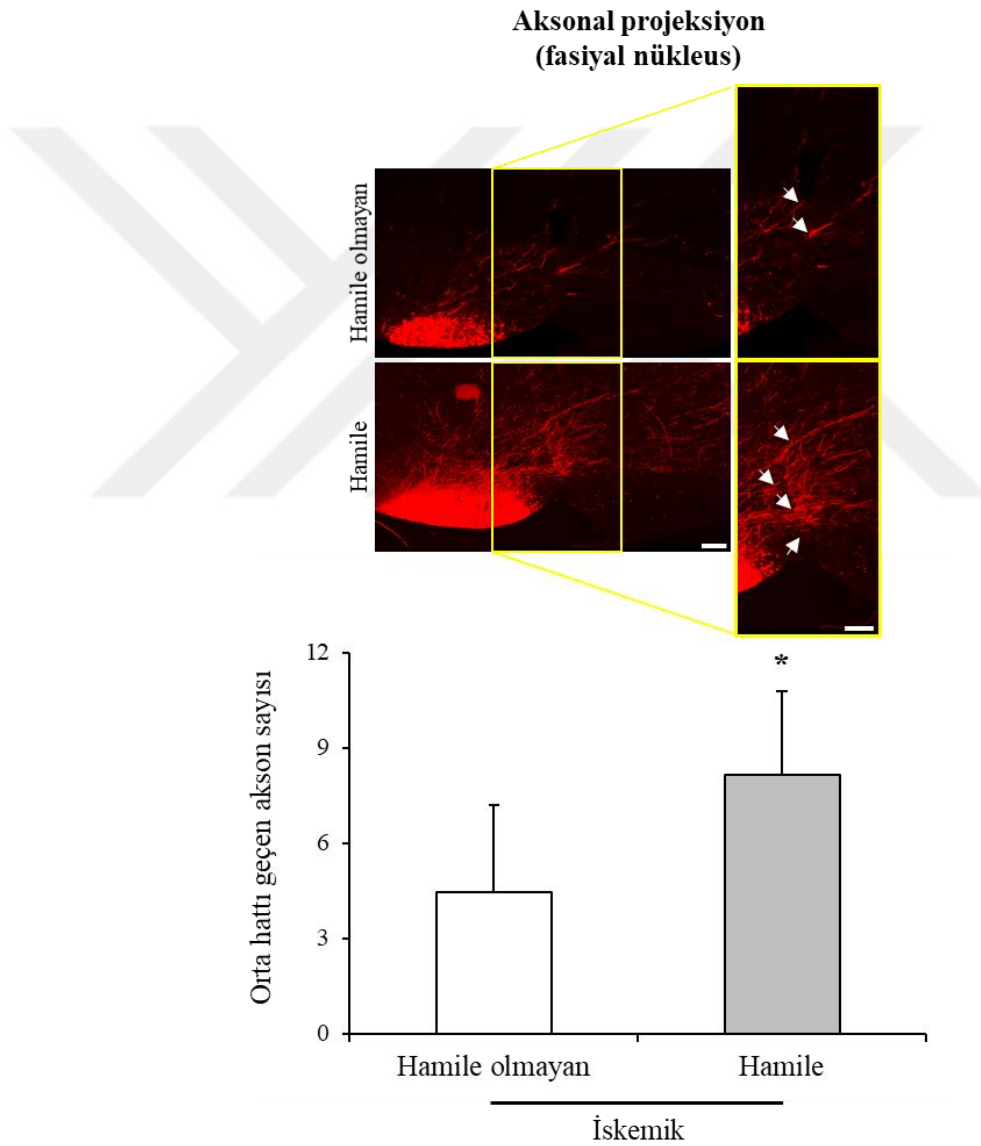
Şekil 67.1 İskemik hasar sonrası glial yara alanının değerlendirilmesi.

Hamile ve hamile olmayan farelere 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra glial yara değerlendirilmiştir (Sarı işaretli alan glial yara alanını göstermektedir; bar 500 µm'yi göstermektedir.).

İskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra hamile olan ve hamile olmayan farelerin beyin kesitlerine glial yaranın değerlendirilebilmesi amacıyla GFAP boyaması yapılmıştır. Boyamanın yapılmasının ardından kesitlerin konfokal mikroskopunda (LSM800, ZEISS, Almanya) fotoğrafları çekilmiştir. Glial yaranın değerlendirilmesi amacıyla ipsilateraldeki striatum GFAP (+) alan belirlenmiş ve mikroskobun kendi programı (ZEN Blue, ZEISS) ile bu alanlar ölçülmüştür. Her iki grubun ayrı ayrı değerleri hesaplanmış ve ayrı ayrı ortalamaları alınmıştır. İskemik

hamile olan farelerin glial yara alanı $1,26+0,82 \text{ mm}^2$ olarak bulunmuşken, iskemik hamile olmayan farelerin $2,25+0,69 \text{ mm}^2$ olarak bulunmuştur. İskemik hamile farelerin glial yara alanı, iskemik hamile olmayan farelerin glial yara alanı ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.7.1).

6.8.İskeminin İndüklenmesinin Ardından Uzun Dönemde Aksonal Projeksiyonun Değerlendirilmesi



Şekil 68.1. İskemik hasar sonrası aksonal uzamanın fasiyal nükleus seviyesinde değerlendirilmesi.

Hamile ve hamile olmayan farelere 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra fasiyal nükleus seviyesinde kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere geçen aksonlar sayılmıştır (Bar 100 µm'yi göstermektedir.) (p=0,020).

İskemik hamile ve iskemik hamile olmayan farelere 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonunun yapılmasının ardından 55 gün setinde bulunan iskemik hamile ve iskemik hamile olmayan tüm farelerin kontralateral motor kortekslerine 42. günde Biotinlenmiş Dekstran Amin (BDA) enjeksiyonu yapılmıştır. Ardından fasiyal nükleus seviyesinden (Bregma -5,68 mm) aksonal projeksiyonu değerlendirmek amacıyla kesitler alınmıştır. Alınan kesitlere BDA boyması yapılmış ve kesitler Axiozoom (Zeiss, Almanya) floresan mikroskobu ile fotoğraflanmıştır. Aksonal projeksiyonun değerlendirilebilmesi için iki hemisfer arasına 1000 µm'lik hayali bir sanal çizgi çekilmiş ve bu sanal çizgiyi geçen aksonlar sayılmıştır. Sanal çizgiyi geçen aksonların değerleri her grup için ayrı ayrı hesaplanmış ve grupların ayrı ayrı ortalamaları alınmıştır. İskemik hamile ve iskemik hamile olmayan gruplar arasında aksonal projeksiyon değerlendirilmesi yapıldığında, hasarın olmadığı kontralateral hemisferden, hasarın olduğu ipsilateral hemisfere doğru olan aksonal projeksiyon, iskemik hamile olmayan grupta $4,43 \pm 2,76$ iken iskemik hamile grupta bu değer $8,13 \pm 2,64$ olarak bulunmuştur. İskemik hamile olan grupta aksonal projeksiyon, iskemik hamile olmayan gruptaki aksonal projeksiyona kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.8.1.**).

Sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel p değerinin belirlenmesinde *bağımsız student t testi* kullanılmıştır. İskemik hamile olmayan ve iskemik hamile grupların arasındaki istatistiksel anlamlılık *p<0,05 olarak ifade edilmiştir.

Tablo 2. Bulguların şematik gösterimi.

Bulgular	Hamile Olan İskemik vs. Hamile Olmayan İskemik
LDF	↔
Apoptotik Hücre Sayısı	↔
Nöronal Sağkalım	↑
Atrofi	↓
Nörogenez	↑
Gliogenez	↓
Glial Hasar	↓
Aksonal Projeksiyon	↑

Tüm sonuçların bir arada değerlendirilebilmesi için yapılan Tablo 2’de, hamile olan iskemik farelerden elde edilen sonuçlarla, hamile olmayan iskemik farelerden elde edilen sonuçların kıyaslanması sonucu “↔” istatistiksel olarak değişmeyen değerleri, “↑” artan ve “↓” azalan parametreleri göstermektedir.

7.TARTIŞMA

Bu tezde, hamileliğin, iskemik hasar sonrası *in vivo* şartlarda i) nöronal hayatta kalım, ii) glial yara iii) apoptotik hücre ölümü, iv) atrofi, v) nörogenez, gliogenez ve vi) aksonal projeksiyon üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaları çalışmak amacıyla insanlarda inme vakalarının çoğunda görülen OSA tıkanması fare modeli kullanılarak mimik edilmiştir.

Orta serebral arterin doğru bir şekilde tıkanmasının tespit edilebilmesi için kan akımındaki düşüşü anlık olarak takip edebilmek amacıyla Laser doppler flowmetri cihazı kullanılmıştır. Beyin kan akımının ölçümü iskeminin indüklenmesinden önce başlamış ve beyin kan akımındaki düşüş ile orta serebral arterin doğru olarak tıkanmış teyit edilmiştir. Kullanılan 30 dakika orta serebral arter tıkanma metodu ile farelerin striatumlarında bir hasar meydana gelmekte ve oluşan bu hasar kortekse ilerleyememektedir. Nöronal sağ kalımın değerlendirilebilmesi amacıyla 3. günde deneyler sonlandırılmış ve farelerden alınan beyin kesitlerine NeuN boyaması yapılmıştır. Hamileliğin iskemi üzerindeki glial hasara etkisinin araştırılabilmesi amacıyla 30 dakika iskemi geçirmiş ve 55 gün reperfüzyona maruz bırakılmış farelerin beyinlerinden elde edilen kesitlere GFAP boyaması yapılmıştır. Hamileliğin, oluşan iskemik hasara olan iyileştirici etkisinin gösterilmesi amacıyla, apoptotik hücre hasarının tamamlandığı 72. saatte fareler sakrifiye edilerek beyinleri çıkarılmış ve immünohistokimyasal analizler için 18 µm'lik kesitler alınmıştır. Uzun dönemde korpus kallozum ve striatum bölgesinde meydana gelen atrofının tespit edilmesi amacıyla 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerden elde edilen beyin kesitlerine *Cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Hamileliğin nörogenez üzerine etkilerinin değerlendirilebilmesi amacıyla uzun dönem kesitlerine, NeuN/BrdU ikili boyaması yapılmıştır. Yine uzun dönem kesitlerine GFAP/BrdU ikili boyaması yapılarak gliogenezin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin beyinlerinden alınan kesitlere GFAP boyaması yapılarak hamilelik sonrası glial yara alanındaki değişimler ölçüler hamileliğin etkisi değerlendirilmiştir. 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonunun yapılmasının ardından 55 gün setinde bulunan iskemik hamile ve iskemik hamile olmayan tüm farelerin kontralateral motor kortekslerine 42. günde Biotinlenmiş Dekstran Amin

(BDA) enjeksiyonu yapılmıştır. Ardından fasiyal nükleus seviyesinde alınan kesitlere, iskemik hamile ve iskemik hamile olmayan gruplar arasındaki aksonal projeksiyonu değerlendirmek amacıyla BDA boyaması gerçekleştirilerek beyin plastisitesi değerlendirilmiştir.

İndüklenen iskeminin süresinin 30 dakika olarak gerçekleştirilmesini takip etmek amacıyla farelerin beyin kan akımları LDF ile kontrol edilmiştir. LDF ile bölgesel kanlanma ölçümünün tam ve net bir ölçümü gerçekleştirilemiyor olsa da bu yöntem ile non-invaziv ve sürekli olarak striatumdaki kan akımının anlık değişimi rölatif olarak ölçülmektedir (145, 146). Kısa ve uzun dönem için yapılan setlerde serebral kanlanmanın, operasyon öncesine göre yaklaşık %80'lik bir düşüş gösterdiği görülmüştür (**Şekil 6.1.1.**). 30 dakika iskeminin gerçekleşmesinin ardından, reperfüzyon aşamasında tüm gruplarda kan akımı değeri tekrar operasyon öncesi değere yakın olan yaklaşık %100 seviyelerine ulaşmıştır (**Şekil 6.1.1.**). Reperfüzyon aşamasındaki kanlanma değerlendirildiğinde, gruplar arasında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Hamile olan ve hamile olmayan fareler arasında serebral kanlanmada istatistiksel anlamlı bir fark görülmemesi literatürle paralel bir bilgi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Literatürde hamile kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar, hamilelikteki kan akımının farklı parametrelere göre değişebildiğini göstermektedir. Serebral kanlanmanın, her ne kadar karbondioksit ve oksijen ile ilişkisi olduğu biliniyor olsa da hamilelikte damar çapında meydana gelen değişiklikler de serebral kanlanmada değişimler meydana getirebilmektedir. Ek olarak, hamilelikte meydana gelen aneminin, artmış östrojen seviyelerinin, azalmış kan viskozitesinin ve artmış kardiyak yanıtların da serebral kanlanmanın artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hamile kadınlardaki kan basıncı değerleri hamileliğin hangi trimesterde bulunduğuyla ilgili olarak da farklılık gösterebilmektedir (147). Örneğin hamilelik hormonu olarak bilinen progesteron, 1. ve 2. trimesterde damarların vazodilatasyonuna sebep olarak kan basıncının düşük olmasına neden olabilmektedir. Fakat 2. trimesterin ortalarında ve 3. trimesterde kan basıncı azalarak kan akımının arttığı düşünülmektedir. Bunun ise bebeğin beslenmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir çünkü annenin kan basıncı yüksek olduğunda bebek anne tarafından yeterli oksijen ve besini alamamaktadır.

Üçüncü trimesterde orta serebral arterden geçen kan akımının ve kan akım hızının son haftalarda azalmaya başladığı gözlemlenmektedir. Hamileliğin 3. trimesterinin ilk aylarında bebeğe giden kan volümünün artması için annenin kan basıncı azalmakta, ardından bebek doğmadan birkaç hafta önce, hamilelik öncesi seviyeye dönmektedir. Bu yüzden 3. trimesterde annede kan basıncının azaldığı görülmektedir. (148, 149)

Tüm bunların yanında, iskemi meydana geldiğinde ise vazokontrüksiyon gerçekleşmektedir. Hamile kadınlarda ise progesterona bağlı olarak tam tersi bir durum meydana gelmektedir. Tez doğrultusunda yapılan hamile farelere 2. trimesterde iskeminin indüklendiği süre boyunca alınan LDF kayıtlarında, iskemik hamile olmayan ve iskemik hamile olan grupların, kan akımı değerleri arasında istatistiksel anlamlı olarak bir fark görülmemiştir. Bunun, hamilelikte 2. trimesterde kan akımının, normale kıyasla daha yüksek olması dolayısıyla, iskemiye bağlı olarak kan akımında meydana gelen düşüşü kompanse edebileceği ihtimali olduğunu düşündürmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda, hamilelik sırasında yüksek progesteron seviyelerine bağlı, sistemik vazodilatasyon meydana gelmekte ve bunun da serebral kan akımının azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir (150).

İskeminin indüklenmesinin ardından, OSA tıkanıdığı için striatumda sekonder bir hasar meydana gelmekte ve buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümü görülmektedir (145, 146). İn sitü hücre ölüm kiti kullanılarak apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır. DNA kırıklarının oluşması apoptotik hücre ölümünün son aşaması olarak karşımıza çıkmakta ve in sitü hücre ölüm kiti ile istenilen gruplar arasındaki apoptotik hücre sayısındaki zamana bağlı değişimlerin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Hamile olan ve hamile olmayan farelere iskemi indüklenmesinin ardından 3 gün sonra meydana gelen DNA kırıkları değerlendirilmiştir. Striatum bölgesinden 12 alan sayılmış ve hamile olan ve hamile olmayan gruplar arasındaki TUNEL (+) hücreler değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir (**Şekil 6.2.1.**). Hamilelik ve iskemik inme ilgili olarak literatürde apoptozun sonuçlarının net olarak değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat, hamilelik sırasında plasenta için apoptozun önemini anlatan birçok çalışma mevcuttur. Apoptoz, plasentanın gelişimi için önemli olmasına karşın aynı zamanda hamilelik ile ilgili hastalıkların patofizyolojilerin de rol oynamaktadır

(151). Bunun dışında literatürde yapılan birçok çalışmada, apoptozun plasentanın normal gelişiminde, yeniden şekillenmesinde ve yaşlanmasında önemli bir rol aldığı gösterilmektedir. Plasentanın doğru bir şekilde gelişmesini, farklılaşmasını ve fonksiyonunu gerçekleştirmek için ihtiyacı olan bu mekanizmada meydana gelen herhangi bir dengesizliğin, hamilelik sırasında preeklampsi ve intrauterin büyüme geriliğine sebep olabileceği düşünülmektedir(152). Yapılan çalışmalar ile, apoptozisin 3. trimesterde, 2.trimestere kıyasla arttığı ve bunun yaşlanan plasentanın doğal bir sonucu olduğu düşünülmektedir (153).

Hamile olan ve hamile olmayan iki grup arasında iskeminin indüklenmesinin ardından kısa dönemde, hamileliğin nöronal sağkalım üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 3 gün beyin kesitlerine NeuN antikoruna kullanılarak immüno Floresan boyama yapılmıştır. İpsilateral striatumda ve kontralateral striatumda, NeuN (+) hücreler sayılmıştır. İskemik hamile olan grupta, iskemik hamile olmayan gruba göre iskeminin indüklenmesinden 3 gün sonra nöronal sağkalımda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür (**Şekil 6.3.1.**).

İkinci trimesterde 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra ipsilateral hemisferdeki nörojeniz değerlendirilmiştir. Nörojenizin değerlendirilmesi amacıyla uzun dönem kesitlerine, NeuN/BrDU ikili boyaması yapılmış ve her iki grup için de hasarın olduğu ipsilateral hemisferde NeuN/ BrDU (+) hücreler sayılmış, 55 gün sonra iskemik hamile olan grupta, iskemik hamile olmayan gruba göre nörojenizin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek miktarda olduğu görülmüştür (**Şekil 6.5.1.**).

Hamilelikte önemli bir hormon olan östrojenin, sinir sisteminin gelişimini ve işlevini etkilediği bilinmektedir (154). Geçmiş yıllarda yapılan literatür çalışmaları ile östrojenin, nöron fizyolojisini modüle ettiği gösterilmektedir (155). Östrojenin, nöronlar arasındaki plastisiteyi artırdığının bilinmesinden dolayı tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır(156). Hamilelikte östrojen seviyesinin ikinci trimesterde neredeyse 40 katı kadar arttığı gösterilmektedir. Östrojen, presinaptik uçtan salınarak, post sinaptik uçtaki ilgili reseptöre bağlanarak, PKA aktivasyonunu gerçekleştirir. PKA'nın, CREB fosforilasyonunu gerçekleştirerek, uzun dönem hafızasını güçlendirmek için sinaptogenez ve nörojenizi tetiklediği bilinmektedir (157, 158).

İnsanlarda ve kemirgenlerde yapılan çalışmalar ile, yumurtalık hormonlarında (östrojen ve progesteron) meydana gelen ani düşüşün, beyinde hasara neden olduğu gösterilmektedir (159).

Beyinde meydana gelen bu hasar sonrası, nöron ölümleri sonucu sinaptik bağlantılar azalmaktadır. Bu sinaptik bağlantıların yeniden kurulabilmesi amacıyla, yeni nöron oluşumuna ihtiyaç duyulmaktadır (145, 146). Kemirgen ve insan beyindeki nörogenezin subventriküler bölgede ve dentat girusta meydana geldiği gösterilmektedir (160). Yetişkin beyinde çalışmalar yapan Gould ve arkadaşları, seks hormonlarının yeni nöronların oluşumunda etkili olduğunu düşünmektedir (161). Gould ve arkadaşlarının yaptığı diğer çalışmalar ile, östrojen seviyesinde meydana gelen değişikliklerin, nörogenezin gerçekleşebilmesi için gerekli olan progenitor nöronal hücrelerin, proliferasyonlarında da değişiklik meydana getirdiği kaydedilmiştir (162). Buna ek olarak, östrojen seviyesinde meydana gelen azalmanın, çoğalan nöron sayısını azalttığı da gösterilmektedir (163). Literatürde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, hamilelik ve iskemi arasındaki ilişkilerin mekanizmaları net olarak anlaşılammamaktadır. Hamilelik sırasında birçok hormonal değişim meydana geldiği için, literatürde yapılan çalışmalar ile ilgili, hamilelikte iskemi üzerine farklı tartışmalar bulunmaktadır. Yapılan literatür taramaları, östrojenin iskemi üzerine de farklı etkileri olduğunu göstermektedir. Farklı çalışmalar, östrojenin yararlı ve zararlı etkilerinden bahsediyor olsa dahi, östrojenin iskemi üzerine iyileştirici etkilerinin olması yadsınmamaktadır. Bu sebepten dolayı, yapılan tez çalışmaları doğrultusunda, iskemi geçirmiş hamile farede artmış nöronal sağkalım ve nörogenezin östrojenle ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Fakat östrojenin, iskemi üzerindeki farklı etkilerinin mevcut olmasından dolayı, iskemi geçirmiş hamile faredeki artmış nöronal sağkalımın ve nörogenezin, östrojen seviyesinin artmasıyla ilişkilendirilebilmesi için, tez kapsamında bulunan gruplara ek olarak östrojenin baskılandığı bir grup da eklemek gerekmektedir. Ancak bu doğrultuda östrojen seviyesinin varlığındaki ve yokluğundaki mekanizmalar tartışılarak, nöronal sağkalım ve nörogenezin artması, östrojen hormonu ile ilişkilendirilebilir. Tüm bu ilişkilendirmeler yapılırken, hamilelik sırasında daha birçok hormonun aktif rol oynadığı da unutulmamalıdır. Bu sebeple, hormona bağlı değerlendirilmelerin yapılması için oldukça kapsamlı bir araştırma gerektirmektedir. İkinci trimesterde 30

dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra ipsilateral hemisferde gliogenez değerlendirilmiştir. Gliogenezin değerlendirilmesi amacıyla GFAP ve BrdU ikili boyaması yapılmıştır. İskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan grupların hemisferlerinde bulunan GFAP/BrdU (+) hücreler sayılmış ve iskemik hamile olmayan grupta, iskemik hamile gruba göre gliogenezin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür.

Gliyal yaranın, iskemiden 6 gün sonra oluşmaya başladığı ve bunun sonucunda GFAP (+) hücrelerin morfoloji değiştirerek, iskemik alanın sınır kısmına göç ederek, yoğun bir şekilde toplandığı ve hasarı sınırlandırdığı bilinmektedir (145). Hamile ve hamile olmayan farelere 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra gliyal yara değerlendirilmiştir. Gliyal yaranın değerlendirilebilmesi amacıyla GFAP boyaması yapılmış ve ipsilateraldeki striatum GFAP (+) alan belirlenerek bu alanlar ölçülmüştür. İskemik hamile farelerin gliyal yara alanı, iskemik hamile olmayan farelerin gliyal yara alanı ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.7.1.**). Gliyal yarada yer alan gliaların, hasarı onarabildikleri ve hasarlı alanı koruyarak hasarın yayılmasını engellemeleri dışında, aksonal uzamayı inhibe ettikleri de bilinmektedir. Bu sebeple, tez kapsamında yapılan çalışmalar ile gliyal yarada meydana gelen azalmanın aksonal uzamayı etkileyip etkilemediğini anlamak amacıyla GFAP (+) boyanan kesitlerde aksonal uzama değerlendirilmiştir.

Hamile ve hamile olmayan farelere 30 dakikalık iskeminin indüklenmesinin ardından 55 gün sonra fasiyel nükleus seviyesinde kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere geçen aksonlar sayılmıştır. Aksonal projeksiyonun değerlendirilebilmesi için iki hemisfer arasına 1000 µm'lik hayali bir sanal çizgi çekilmiş ve bu sanal çizgiyi geçen aksonlar sayılmıştır. İskemik hamile olan grupta aksonal projeksiyonun, iskemik hamile olmayan gruptaki aksonal projeksiyona kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.8.1.**). Böylelikle iskemik hamile olmayan grup ile iskemik hamile olan grup kıyaslandığında, hamileliğin iskemi üzerindeki aksonal uzamayı artıran etkisi dikkat çekmektedir.

Astroditler, merkezi sinir sisteminde bulunan glia hücresidir. Astroditler, ilk araştırmalarda destekleyici hücresler olarak bilinseler de daha sonraki yapılan çalışmalarla astroditlerin, heterojen bir hücre popülasyonu olduğu ve nöronal farklılaşma ve göç, serebral kan akışının düzenlenmesi, sinaps oluşumu gibi birden çok önemli biyolojik süreçte yer aldıkları düşünölmektedir (164). Tüm bunlara ek olarak astroditlerin, sinir sistemi üzerinde en yaygın hücresler olduğu da bilinmektedir. Nöronlar, fizyolojik ihtiyaçlarını karşılayabilmek için, astroditler tarafından sağlanan, glikoz, nörotrofik faktör ve nörotransmitter gibi maddelere ihtiyaç duymaktadırlar (165). Aynı zamanda astroditler, mikroglia aktivasyonunu gerçekteştirerek, kan-beyin bariyeri geçirgenliğini düzenlemektedirler. Bu sayede de bağışıklık sisteminde önemli bir role sahip olmaktadır (166). Glial fibriler asidik protein (GFAP), bir ara filament proteindir ve merkezi sinir sisteminde en yoğun olarak astroditlerde eksprese olmaktadır (167). Beyinde meydana gelen yaralanmalar sonucunda, GFAP, hücre dışı matris proteinleri (kondroitin sülfat proteoglikan gibi) proteinlerin ekspresyonları artmaktadır. Bunun yanında, yaralanma sırasında, hasar bölgesini çevreleyen glial yara meydana gelmektedir (168, 169). Glial yara alanı sayesinde, glial bir bariyer meydana gelmektedir. Bu sayede hasarın yayılması önlenerek, hücre dışı iyon dengesini sağlamaktadır. Tüm bunların yanında, glial yara alanı, nöronların beslenme ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla kılcal damarların revaskülarizasyonunu uyarmaktadır. Fakat glial yaranın mevcut olması, aksonal rejenerasyona engel olmaktadır. Bunun sebebi reaktif astroditlerin, akson büyümesini engelleyen belirli büyüme engelleyici faktörleri sentezlemesidir. Ayrıca, glial yara oluşumu meydana geldiğinde hücre dışı proteinlerin ekspresyonlarının artmasına bağılı olarak hasar alanında fiziksel bir bariyer meydana gelmektedir. Bu fiziksel bariyere bağılı olarak, aksonların geçişinde ek bir engel olmaktadır (170). Literatürde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, hasar alanının oluşması için astrodit miktarının, dolayısıyla GFAP miktarının arttığı görölmektedir. Fakat reaktif astrodit miktarının fazla olması ve glial bariyerde bulunan kondroitin sülfat preteoglikan, vimentin gibi proteinlerin glial bariyeri daha sıkı hale getirmesine bağılı olarak aksonal büyümenin inhibe edildiği görölmektedir. Buradan yola çıkılarak, tez kapsamında yapılan araştırmalar sonucunda, gliogenezin yani GFAP (+) hücre miktarının hamile olan iskemik farede, hamile olmayan iskemik fareye kıyasla istatistiksel anlamlı ölçüde azaldığı

görülmektedir. Literatür taramalarından yola çıkılarak, azalan GFAP (+) hücre miktarının, yine tez kapsamında yapılan glial yara ve aksonal uzama sonuçları ile bağdaştırmak mümkün olabilmektedir. Buradan yola çıkılarak, GFAP (+) hücre miktarının, hamile olan iskemik farede azalması, glial yaranın azalması ile ilişkilendirilebilmektedir. GFAP (+) hücre sayısının azalması ile glial yaranın iyileşmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu düşündürse de bu genel bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat literatürde yapılan kapsamlı çalışmalar doğrultusunda astrosit ve glial hasarın hamilelikle ilgili ilişkisi net olarak değerlendirilememektedir. Astrositlerin miktarındaki azalma glial hasarla ilişkilendirilebilirken, bu azalmanın hamilelik ile ilişkisi net olarak değerlendirilememektedir. Östrojenin, iskemik hasar gibi birçok hastalıkta nöroprotektif bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Östrojen seviyesinin artması ile birlikte, astrositlerden nöroprotektif faktörlerin salınması gerçekleşmektedir (171). Beyinde bir hasar meydana geldiğinde östrojenin, reaktif astrosit sayısını azalttığı bilinmektedir (172). Östrojenin, hamileliğin 2.trimesterinde 40 katı kadar arttığı bilinmesi bilgisi ile yola çıkılarak astrosit sayısının ve glial yaranın azalması östrojenle ilişkilendirilebilir olsa da böyle karmaşık bir mekanizmada meydana gelen değişimler, tek bir hormonun (östrojen) nöroprotektif etkisi ile sınırlandırılmamalıdır. Bu sebeple, mekanizmanın içeriği tam olarak bilinmese de hamile iskemik farelerde glial yara alanının ve GFAP (+) hücre miktarının azalması, hamileliğin iskemiye karşı iyileştirici bir etki olabilme ihtimali üzerinde düşündürebilmektedir. Buna bağlı olarak, plastisitede meydana gelen artışta bu durumu destekleyici bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sayede, iskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan farelerde bu sonuçlar değerlendirildiğinde, hamileliğin glial yara ve gliogenezi azaltarak ve de aksonal uzamayı artırarak iskemi üzerinde, nöroprotektif etkisi olabileceği sonucunu karşımıza çıkarmaktadır.

Literatürde sıçan üzerinde yapılan bir çalışmada, OSA tıkanmasının ardından, yaklaşık olarak 30 gün sonra ipsilateral striatum ve korpus kallozum bölgelerinde atrofi meydana geldiği görülmektedir (173). Buna ek olarak farelerde yapılan 30 dakikalık OSA tıkanması sonrasında, uzun dönemde striatum bölgesinde atrofi olduğu gösterilmektedir (174, 175). Uzun dönemde korpus kallozum ve striatum bölgesinde meydana gelen atrofının tespit edilmesi amacıyla 55 gün sonra sakrifiye edilen

farelerden elde edilen beyin kesitlerine *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. *Cresyl violet* boyası ile yalnızca nöronlar boyanabildiği için, kesitlerdeki striatum, hemisfer ve korpus kallozum alanları ölçülebilmektedir. Kesitler hasarlı ve hasarsız korpus kallozum, striatum ve hemisfer olmak üzere fotoğraflanmıştır. Ardından korpus kallozum, striatum ve hemisfer alanları Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir grubun korpus kallozum, striatum ve hemisfer alanları ayrı ayrı hesaplanmış ve tüm grupların ayrı ayrı ortalamaları alınmıştır. Hesaplama, ipsilateral alanlardan ölçülen değerler, kontralateral alanlardan ölçülen değerlerden çıkarılarak yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bu değerlerin kontralaterale göre yüzdeleri hesaplanmıştır. İskemik hamile ve iskemik hamile olmayan grupların atrofik alanları değerlendirilmiş, ipsilateral korpus kallozumun her iki grubunda kontralateral korpus kallozumuna göre hasarlı ve hasarsız alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. İskemik hamile olan ve iskemik hamile olmayan farelerin striatum ve hemisferleri kontralateraline göre değerlendirildiğinde iskemik hamile olan grubun iskemik hamile olmayan gruba göre post-iskemik atrofi alanının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. İskemik hamile olmayan farelerin kontralateraline göre ipsilateral striatum alanında %31 oranında bir düşüş, ipsilateral hemisferde, kontralateral hemisfere göre ise %5 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. İskemik hamile farelerin kontralateraline göre ipsilateral striatum alanında %51 oranında bir düşüş, ipsilateral hemisferde kontralateral hemisfere göre ise %15'lik bir düşüş gözlemlenmiştir (**Şekil 6.4.1.**). Atrofi ile apoptoz sonuçları değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir ilişki karşımıza çıkmamaktadır. Apoptotik hücre ölüm sonuçları değerlendirildiğinde iskemik hamile olmayan ve iskemik hamile olan grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır. Atrofinin dokudaki hücre kaybı ile ilişkilendirileceği düşünülse dahi, atrofinin uzun dönem kesitlerinde değerlendirildiği unutulmamalıdır. Apoptotik hücre mekanizmaları ise iskeminin indüklenmesinden 3 gün sonra tamamlanmaktadır. Bu sebeple atrofinin değerlendirildiği, uzun dönemde tamamlanan hasar mekanizmaları sebebi ile apoptotik hücre ölümü ile atrofi arasındaki ilişki net olarak değerlendirilememektedir. Hamilelik sırasında beyinde meydana gelen değişimler oldukça dikkat çeken bir konudur. 2017 yılında hamile kadınlarda yapılan bir çalışmada, hamilelik sırasında gri maddede azalma meydana geldiği manyetik rezonans (MR) tekniği kullanılarak gösterilmektedir (176). Gri maddenin

küçülmesi, ilk bakışta kötü olarak gözükse de aslında başka teorilerin gün yüzüne çıkmasına neden olmaktadır. Elsenie ve arkadaşları, hacim kaybının kötü bir sonuç olmadığını, aksine beyindeki ince bağlantı ayarlarını sağlaması için gerekli olduğunu ileri sürmekteydi. Yapılan araştırma doğrultusunda, beyindeki küçülmenin en çok gerçekleştiği alanlar, duyu, anlama, empati gibi alanlar olarak tanımlanarak, annenin bebekle ilişkisini artırmak amacı ile olabileceğini düşündürmekteydi. Aynı zamanda atrofi sayesinde, plastisitenin de artarak bölgeler arasındaki bağlantıyı sağladığı düşünülmektedir. Fakat yapılan çalışmaların, hamile kadınlar üzerinde olduğuna dikkat çekilmiş ve bu çalışmaların deney hayvanları üzerinde, yeterli grup ve yeterli tekrar sayıları ile daha titiz bir çalışma gerektirdiğini belirtmişlerdir (177). Buradan yola çıkılarak, tez kapsamında yapılan araştırmalar ile tüm bu literatür bilgileri harmanlandığında, iskemik hamile olan grubun, ipsilateral striatumunda kontralateral striatuma kıyasla, atrofi alanında azalma meydana gelmesi ve iskemik hamile olan grupta plastisitenin artmış olması sonuçları, hamileliğin iskemik hasar üzerinde iyileştirici bir etkisi olabilme ihtimalini akla getirmektedir.

8.SONUÇ

Tüm bu datalar incelendiğinde, hamileliğin iskemik hasar üzerindeki etkilerinin anlaşılması amacıyla, insanlarda meydana gelen iskemik beyin felcini mimik edebilmek için, hamile ve hamile olmayan farelerde orta serebral arter tıkanması metodu kullanılmıştır. İskemi geçirmiş farelerde hamileliğin, beyin kan akımında ve apoptotik hücre sayısında bir değişim meydana getirmediği ancak nöronal sağ kalımı, nörojenezi ve aksonal projeksiyonu artırdığı ve gliogenezi, glial yara alanını ve striatumda meydana gelen atrofiyi azalttığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında hamileliğin, iskemik hasarda zamana bağlı olarak etki ettiği mekanizmaların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Hamile farelerde, serebral iskemi sonrası akut ve kronik dönemde meydana gelen değişimlerin incelenmesi ile birlikte hamilelik sırasında meydana gelen iskemik hasarın, normal zamanda (hamile olunmayan) meydana gelen iskemik hasara kıyasla daha az hasar meydana getirmektedir. Buradan yola çıkılarak, hamilelik sürecinin, iskeminin zararlı etkisini azalttığı sonucuna varılabilmektedir.

9.KAYNAKLAR

1. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397. 1999.
2. Virani, SS, Alonso, A, Benjamin, EJ, Bittencourt, MS, Callaway, CW, Carson, AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **141**, e139-e596. 2020.
3. Robbins, NM, and Swanson, RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. *Stroke* **45**, 1881-1886. 2014.
4. Xiao, C, and Robertson, RM. Timing of Locomotor Recovery from Anoxia Modulated by the white Gene in *Drosophila*. *Genetics* **203**, 787-797. 2016.
5. Stokum, JA, Gerzanich, V, and Simard, JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 513-538. 2016.
6. Kim, MJ, Hur, J, Ham, IH, Yang, HJ, Kim, Y, Park, S, et al. Expression and activity of the na-k ATPase in ischemic injury of primary cultured astrocytes. *Korean J Physiol Pharmacol* **17**, 275-281. 2013.
7. Brassai, A, Suvanjev, RG, Ban, EG, and Lakatos, M. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* **112**, 1-6. 2015.
8. Ritzel, RM, Patel, AR, Sychala, M, Verma, R, Crapser, J, Koellhoffer, EC, et al. Multiparity improves outcomes after cerebral ischemia in female mice despite features of increased metabovascular risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E5673-E5682. 2017.
9. Jaigobin, C, and Silver, FL. Stroke and pregnancy. *Stroke* **31**, 2948-2951. 2000.
10. Brunton, PJ, and Russell, JA. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat Rev Neurosci* **9**, 11-25. 2008.
11. Napso, T, Yong, HEJ, Lopez-Tello, J, and Sferruzzi-Perri, AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol* **9**, 1091. 2018.
12. McCombe, PA. The Short and Long-Term Effects of Pregnancy on Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Clin Med* **7**2018.

13. Voskuhl, R, and Momtazee, C. Pregnancy: Effect on Multiple Sclerosis, Treatment Considerations, and Breastfeeding. *Neurotherapeutics* **14**, 974-984. 2017.
14. Chene, G, Beiser, A, Au, R, Preis, SR, Wolf, PA, Dufouil, C, et al. Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimers Dement* **11**, 310-320. 2015.
15. Paganini-Hill, A, and Henderson, VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* **140**, 256-261. 1994.
16. Nebel, RA, Aggarwal, NT, Barnes, LL, Gallagher, A, Goldstein, JM, Kantarci, K, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement* **14**, 1171-1183. 2018.
17. Fox, M, Berzuini, C, and Knapp, LA. Maternal breastfeeding history and Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis* **37**, 809-821. 2013.
18. Adams, HP, Jr., Bendixen, BH, Kappelle, LJ, Biller, J, Love, BB, Gordon, DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35-41. 1993.
19. Reeves, MJ, Arora, S, Broderick, JP, Frankel, M, Heinrich, JP, Hickenbottom, S, et al. Acute stroke care in the US: results from 4 pilot prototypes of the Paul Coverdell National Acute Stroke Registry. *Stroke* **36**, 1232-1240. 2005.
20. Xing, C, Arai, K, Lo, EH, and Hommel, M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* **7**, 378-385. 2012.
21. Mitsios, N, Gaffney, J, Kumar, P, Krupinski, J, Kumar, S, and Slevin, M. Pathophysiology of acute ischaemic stroke: an analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets. *Pathobiology* **73**, 159-175. 2006.
22. Bang, OY, Saver, JL, Alger, JR, Starkman, S, Ovbiagele, B, Liebeskind, DS, et al. Determinants of the distribution and severity of hypoperfusion in patients with ischemic stroke. *Neurology* **71**, 1804-1811. 2008.
23. Ding, S. Ca(2+) signaling in astrocytes and its role in ischemic stroke. *Adv Neurobiol* **11**, 189-211. 2014.

24. Lai, TW, Zhang, S, and Wang, YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **115**, 157-188. 2014.
25. Sifat, AE, Vaidya, B, and Abbruscato, TJ. Blood-Brain Barrier Protection as a Therapeutic Strategy for Acute Ischemic Stroke. *AAPS J* **19**, 957-972. 2017.
26. Keep, RF, Zhou, N, Xiang, J, Andjelkovic, AV, Hua, Y, and Xi, G. Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids Barriers CNS* **11**, 18. 2014.
27. ElAli, A, and Rivest, S. Microglia in Alzheimer's disease: A multifaceted relationship. *Brain Behav Immun* **55**, 138-150. 2016.
28. Soulet, D, and Rivest, S. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* **8**, 508-518. 2008.
29. Saijo, K, and Glass, CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 775-787. 2011.
30. Boche, D, Perry, VH, and Nicoll, JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* **39**, 3-18. 2013.
31. Heneka, MT, Kummer, MP, Stutz, A, Delekate, A, Schwartz, S, Vieira-Saecker, A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**, 674-678. 2013.
32. Mousa, SA. Adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications. *Methods Mol Biol* **663**, 261-276. 2010.
33. Zhang, L, Wu, J, Duan, X, Tian, X, Shen, H, Sun, Q, et al. NADPH Oxidase: A Potential Target for Treatment of Stroke. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 5026984. 2016.
34. Peng, PL, Zhong, X, Tu, W, Soundarapandian, MM, Molner, P, Zhu, D, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* **49**, 719-733. 2006.
35. Hochhauser, E, Kivity, S, Offen, D, Maulik, N, Otani, H, Barhum, Y, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H2351-2359. 2003.
36. Warner, DS, Sheng, H, and Batinic-Haberle, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* **207**, 3221-3231. 2004.

37. Chen, ZQ, Mou, RT, Feng, DX, Wang, Z, and Chen, G. The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res* **7**, 194-203. 2017.
38. Murad, F, Leitman, DC, Bennett, BM, Molina, C, and Waldman, SA. Regulation of guanylate cyclase by atrial natriuretic factor and the role of cyclic GMP in vasodilation. *Am J Med Sci* **294**, 139-143. 1987.
39. Radomski, MW, Palmer, RM, and Moncada, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **92**, 639-646. 1987.
40. Bath, PM, Hassall, DG, Gladwin, AM, Palmer, RM, and Martin, JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* **11**, 254-260. 1991.
41. Lavi, S, Egbarya, R, Lavi, R, and Jacob, G. Role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow in humans: chemoregulation versus mechanoregulation. *Circulation* **107**, 1901-1905. 2003.
42. Dawson, TM, and Snyder, SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* **14**, 5147-5159. 1994.
43. Dziedzic, T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* **15**, 523-531. 2015.
44. Norbury, CJ, and Hickson, ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 367-401. 2001.
45. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516. 2007.
46. Mattson, MP, Culmsee, C, and Yu, ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* **301**, 173-187. 2000.
47. Igney, FH, and Krammer, PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**, 277-288. 2002.
48. Adams, JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-2495. 2003.
49. Bin, J, Wang, Q, Zhuo, YY, Xu, JP, and Zhang, HT. Piperphentonamine (PPTA) attenuated cerebral ischemia-induced memory deficits via

- neuroprotection associated with anti-apoptotic activity. *Metab Brain Dis* **27**, 495-505. 2012.
50. Hickey, EJ, You, X, Kaimaktchiev, V, Stenzel-Poore, M, and Ungerleider, RM. Lipopolysaccharide preconditioning induces robust protection against brain injury resulting from deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* **133**, 1588-1596. 2007.
 51. Cory, S, and Adams, JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656. 2002.
 52. Li, H, Zhu, H, Xu, CJ, and Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501. 1998.
 53. Green, DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674. 2005.
 54. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-2933. 2001.
 55. Majno, G, and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15. 1995.
 56. Davidson, SM, Adameova, A, Barile, L, Cabrera-Fuentes, HA, Lazou, A, Pagliaro, P, et al. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J Cell Mol Med* 2020.
 57. Whelan, RS, Kaplinskiy, V, and Kitsis, RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* **72**, 19-44. 2010.
 58. Hertz, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* **55**, 289-309. 2008.
 59. Galluzzi, L, Pietrocola, F, Levine, B, and Kroemer, G. Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**, 1263-1276. 2014.
 60. Declercq, W, Vanden Berghe, T, and Vandenaabeele, P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* **138**, 229-232. 2009.
 61. Gallagher, LE, Williamson, LE, and Chan, EY. Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells* **5**2016.

62. Nikolettou, V, Papandreou, ME, and Tavernarakis, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ* **22**, 398-407. 2015.
63. Liang, K, Zhu, L, Tan, J, Shi, W, He, Q, and Yu, B. Identification of autophagy signaling network that contributes to stroke in the ischemic rodent brain via gene expression. *Neurosci Bull* **31**, 480-490. 2015.
64. Fukuta, T, Asai, T, Yanagida, Y, Namba, M, Koide, H, Shimizu, K, et al. Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB J* **31**, 1879-1890. 2017.
65. Lijnen, HR, and Collen, D. Tissue-type plasminogen activator. *Ann Biol Clin (Paris)* **45**, 198-201. 1987.
66. Bargonetti, J, and Manfredi, JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* **14**, 86-91. 2002.
67. Lee, JH, Wei, L, Gu, X, Wei, Z, Dix, TA, and Yu, SP. Therapeutic effects of pharmacologically induced hypothermia against traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **31**, 1417-1430. 2014.
68. Zhao, H, Yenari, MA, Sapolsky, RM, and Steinberg, GK. Mild postischemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke* **35**, 572-577. 2004.
69. Hall, ED. Brain attack. Acute therapeutic interventions. Free radical scavengers and antioxidants. *Neurosurg Clin N Am* **8**, 195-206. 1997.
70. Dohi, K, Miyamoto, K, Fukuda, K, Nakamura, S, Hayashi, M, Ohtaki, H, et al. Status of systemic oxidative stress during therapeutic hypothermia in patients with post-cardiac arrest syndrome. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 562429. 2013.
71. Tang, XN, Liu, L, Koike, MA, and Yenari, MA. Mild hypothermia reduces tissue plasminogen activator-related hemorrhage and blood brain barrier disruption after experimental stroke. *Ther Hypothermia Temp Manag* **3**, 74-83. 2013.
72. Ji, X, Luo, Y, Ling, F, Stetler, RA, Lan, J, Cao, G, et al. Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. *Front Biosci* **12**, 1737-1747. 2007.

73. Brooks, KJ, Hargreaves, I, Bhakoo, K, Sellwood, M, O'Brien, F, Noone, M, et al. Delayed hypothermia prevents decreases in N-acetylaspartate and reduced glutathione in the cerebral cortex of the neonatal pig following transient hypoxia-ischaemia. *Neurochem Res* **27**, 1599-1604. 2002.
74. Zhao, BQ, Wang, S, Kim, HY, Storrie, H, Rosen, BR, Mooney, DJ, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* **12**, 441-445. 2006.
75. Jin, K, Minami, M, Lan, JQ, Mao, XO, Bateur, S, Simon, RP, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4710-4715. 2001.
76. Bernier, PJ, Vinet, J, Cossette, M, and Parent, A. Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res* **37**, 67-78. 2000.
77. Arvidsson, A, Collin, T, Kirik, D, Kokaia, Z, and Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963-970. 2002.
78. Magnusson, JP, Goritz, C, Tatarishvili, J, Dias, DO, Smith, EM, Lindvall, O, et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* **346**, 237-241. 2014.
79. Eriksson, PS, Perfilieva, E, Bjork-Eriksson, T, Alborn, AM, Nordborg, C, Peterson, DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317. 1998.
80. Thored, P, Heldmann, U, Gomes-Leal, W, Gisler, R, Darsalia, V, Taneera, J, et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* **57**, 835-849. 2009.
81. Walton, NM, Sutter, BM, Laywell, ED, Levkoff, LH, Kearns, SM, Marshall, GP, 2nd, et al. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* **54**, 815-825. 2006.
82. Zhang, RL, LeTourneau, Y, Gregg, SR, Wang, Y, Toh, Y, Robin, AM, et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of

- dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci* **27**, 3157-3162. 2007.
83. Ruan, L, Wang, B, ZhuGe, Q, and Jin, K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res* **1623**, 166-173. 2015.
 84. Kanazawa, M, Miura, M, Toriyabe, M, Koyama, M, Hatakeyama, M, Ishikawa, M, et al. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* **7**, 42582. 2017.
 85. Lei, WL, Xing, SG, Deng, CY, Ju, XC, Jiang, XY, and Luo, ZG. Laminin/beta1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res* **22**, 954-972. 2012.
 86. Taguchi, A, Sakai, C, Soma, T, Kasahara, Y, Stern, DM, Kajimoto, K, et al. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev* **24**, 2207-2218. 2015.
 87. Osada, T, Gu, YH, Kanazawa, M, Tsubota, Y, Hawkins, BT, Spatz, M, et al. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by beta(1)-integrins. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 1972-1985. 2011.
 88. del Zoppo, GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* **354**, 553-555. 2006.
 89. Grade, S, Weng, YC, Snayyan, M, Kriz, J, Malva, JO, and Saghatelian, A. Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum. *PLoS One* **8**, e55039. 2013.
 90. Hatakeyama, M, Ninomiya, I, and Kanazawa, M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res* **15**, 16-19. 2020.
 91. Silver, J, Schwab, ME, and Popovich, PG. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020602. 2014.
 92. Faiz, M, Sachewsky, N, Gascon, S, Bang, KW, Morshead, CM, and Nagy, A. Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* **17**, 624-634. 2015.

93. Bavelier, D, Levi, DM, Li, RW, Dan, Y, and Hensch, TK. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci* **30**, 14964-14971. 2010.
94. Brett, M, and Baxendale, S. Motherhood and memory: a review. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 339-362. 2001.
95. Chen, JZ, Sheehan, PM, Brennecke, SP, and Keogh, RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol* **349**, 138-144. 2012.
96. Gonzalez-Mariscal, G, and Melo, AI. Bidirectional Effects of Mother-Young Contact on the Maternal and Neonatal Brains. *Adv Exp Med Biol* **1015**, 97-116. 2017.
97. Kodogo, V, Azibani, F, and Sliwa, K. Role of pregnancy hormones and hormonal interaction on the maternal cardiovascular system: a literature review. *Clin Res Cardiol* **108**, 831-846. 2019.
98. Kim, KH, Young, BD, and Bender, JR. Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Mol Cell Endocrinol* **389**, 65-70. 2014.
99. Liu, LX, and Arany, Z. Maternal cardiac metabolism in pregnancy. *Cardiovasc Res* **101**, 545-553. 2014.
100. Slowik, A, Lammerding, L, Hoffmann, S, and Beyer, C. Brain inflammasomes in stroke and depressive disorders: Regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* **30**2018.
101. Nelson, SH, Steinsland, OS, Wang, Y, Yallampalli, C, Dong, YL, and Sanchez, JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* **87**, 406-411. 2000.
102. Amaral, LM, Kiprono, L, Cornelius, DC, Shoemaker, C, Wallace, K, Moseley, J, et al. Progesterone supplementation attenuates hypertension and the autoantibody to the angiotensin II type I receptor in response to elevated interleukin-6 during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **211**, 158 e151-156. 2014.
103. Arroyo, JA, Anthony, RV, Parker, TA, and Galan, HL. eNOS, NO, and the activation of ERK and AKT signaling at mid-gestation and near-term in an

- ovine model of intrauterine growth restriction. *Syst Biol Reprod Med* **56**, 62-73. 2010.
104. Fabres, RB, da Rosa, LA, de Souza, SK, Cecconello, AL, Azambuja, AS, Sanches, EF, et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. *Metab Brain Dis* **33**, 813-821. 2018.
 105. Kumar, P, and Magon, N. Hormones in pregnancy. *Niger Med J* **53**, 179-183. 2012.
 106. Grattan, DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res* **133**, 153-171. 2001.
 107. Gilsanz, P, Lee, C, Corrada, MM, Kawas, CH, Quesenberry, CP, Jr., and Whitmer, RA. Reproductive period and risk of dementia in a diverse cohort of health care members. *Neurology* **92**, e2005-e2014. 2019.
 108. Wenk, GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* **64 Suppl 9**, 7-10. 2003.
 109. Xu, H, Wang, R, Zhang, YW, and Zhang, X. Estrogen, beta-amyloid metabolism/trafficking, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1089**, 324-342. 2006.
 110. Garcia-Segura, LM, Cardona-Gomez, P, Naftolin, F, and Chowen, JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* **9**, 593-597. 1998.
 111. Pike, CJ. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* **72**, 1552-1563. 1999.
 112. Nilsen, J, and Diaz Brinton, R. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2842-2847. 2003.
 113. Koski, CL, Hila, S, and Hoffman, GE. Regulation of cytokine-induced neuron death by ovarian hormones: involvement of antiapoptotic protein expression and c-JUN N-terminal kinase-mediated proapoptotic signaling. *Endocrinology* **145**, 95-103. 2004.
 114. Dominguez-Caceres, MA, Garcia-Martinez, JM, Calcabrini, A, Gonzalez, L, Porque, PG, Leon, J, et al. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival

- through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene* **23**, 7378-7390. 2004.
115. Steinmetz, D, Ramos, E, Campbell, SN, Morales, T, and Rissman, RA. Reproductive Stage and Modulation of Stress-Induced Tau Phosphorylation in Female Rats. *J Neuroendocrinol* **27**, 827-834. 2015.
 116. Hagell, P, Odin, P, and Vinge, E. Pregnancy in Parkinson's disease: a review of the literature and a case report. *Mov Disord* **13**, 34-38. 1998.
 117. Scott, M, and Chowdhury, M. Pregnancy in Parkinson's disease: unique case report and review of the literature. *Mov Disord* **20**, 1078-1079. 2005.
 118. Demel, SL, Kittner, S, Ley, SH, McDermott, M, and Rexrode, KM. Stroke Risk Factors Unique to Women. *Stroke* **49**, 518-523. 2018.
 119. Robison, LS, Gannon, OJ, Salinero, AE, and Zuloaga, KL. Contributions of sex to cerebrovascular function and pathology. *Brain Res* **1710**, 43-60. 2019.
 120. Roy-O'Reilly, M, and McCullough, LD. Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology. *Endocrinology* **159**, 3120-3131. 2018.
 121. Swartz, RH, Cayley, ML, Foley, N, Ladhani, NNN, Leffert, L, Bushnell, C, et al. The incidence of pregnancy-related stroke: A systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke* **12**, 687-697. 2017.
 122. Murphy, K, and Hannah, M. Relationship of cesarean delivery to lower birth weight-specific neonatal mortality in singleton breech infants in the United States. *Obstet Gynecol* **93**, 630-631. 1999.
 123. Lanska, DJ, and Kryscio, RJ. Risk factors for peripartum and postpartum stroke and intracranial venous thrombosis. *Stroke* **31**, 1274-1282. 2000.
 124. Sanders, BD, Davis, MG, Holley, SL, and Phillippi, JC. Pregnancy-Associated Stroke. *J Midwifery Womens Health* **63**, 23-32. 2018.
 125. Spencer, SJ, Galic, MA, Tsutsui, M, Pittman, QJ, and Mouihate, A. Effects of global cerebral ischemia in the pregnant rat. *Stroke* **39**, 975-982. 2008.
 126. Sells, CM, and Feske, SK. Stroke in Pregnancy. *Semin Neurol* **37**, 669-678. 2017.
 127. Feske, SK, and Singhal, AB. Cerebrovascular disorders complicating pregnancy. *Continuum (Minneap Minn)* **20**, 80-99. 2014.

128. Wigger, A, Lorscher, P, Oehler, I, Keck, ME, Naruo, T, and Neumann, ID. Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. *Endocrinology* **140**, 2843-2849. 1999.
129. Neumann, ID, Johnstone, HA, Hatzinger, M, Liebsch, G, Shipston, M, Russell, JA, et al. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J Physiol* **508** (Pt 1), 289-300. 1998.
130. Fewell, JE. Body temperature regulation in rats near term of pregnancy. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 364-368. 1995.
131. Colbourne, F, Sutherland, G, and Corbett, D. Postischemic hypothermia. A critical appraisal with implications for clinical treatment. *Mol Neurobiol* **14**, 171-201. 1997.
132. Hemmen, TM, and Lyden, PD. Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke* **38**, 794-799. 2007.
133. James, AH, Bushnell, CD, Jamison, MG, and Myers, ER. Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol* **106**, 509-516. 2005.
134. Rosamond, W, Flegal, K, Friday, G, Furie, K, Go, A, Greenlund, K, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **115**, e69-171. 2007.
135. Ventura, SJ, Abma, JC, Mosher, WD, and Henshaw, S. Estimated pregnancy rates for the United States, 1990-2000: an update. *Natl Vital Stat Rep* **52**, 1-9. 2004.
136. Jung, SY, Bae, HJ, Park, BJ, Yoon, BW, and Acute Brain Bleeding Analysis Study, G. Parity and risk of hemorrhagic strokes. *Neurology* **74**, 1424-1429. 2010.
137. Yao, H, Fukuda, K, Araki, Y, Takashima, Y, Uchino, A, Yuzuriha, T, et al. Parity As a Protective Biomarker Against Silent Brain Infarction in Community-Dwelling Older Adults: The Sefuri Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **28**, 702-709. 2019.

138. Franssen, RA, Rzucidlo, AM, Franssen, CL, Hampton, JE, Benkovic, SA, Jr., Bardi, M, et al. Reproductive experience facilitates recovery from kainic acid-induced neural insult in female Long-Evans rats. *Brain Res* **1454**, 80-89. 2012.
139. Mahmood, U, and O'Donoghue, K. Microchimeric fetal cells play a role in maternal wound healing after pregnancy. *Chimerism* **5**, 40-52. 2014.
140. Nassar, D, Khosrotehrani, K, and Aractingi, S. Fetal microchimerism in skin wound healing. *Chimerism* **3**, 45-47. 2012.
141. Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, AB, Turkseven, S, Gurel, B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* **55**, 2565-2576. 2018.
142. Beker, MC, Caglayan, B, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Yalcin, E, Caglayan, A, et al. Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Sci Rep* **9**, 19082. 2019.
143. Caglayan, AB, Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, A, Yulug, B, et al. Acute and Post-acute Neuromodulation Induces Stroke Recovery by Promoting Survival Signaling, Neurogenesis, and Pyramidal Tract Plasticity. *Front Cell Neurosci* **13**, 144. 2019.
144. Caglayan, B, Caglayan, AB, Beker, MC, Yalcin, E, Beker, M, Kelestemur, T, et al. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* **296**, 23-31. 2017.
145. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Kelestemur, T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci* **8**, 422. 2014.
146. 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.
147. Cipolla, MJ. The adaptation of the cerebral circulation to pregnancy: mechanisms and consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 465-478. 2013.

148. Zeeman, GG, Hatab, M, and Twickler, DM. Maternal cerebral blood flow changes in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **189**, 968-972. 2003.
149. Lindqvist, PG, Marsal, K, and Pirhonen, JP. Maternal cerebral Doppler velocimetry before, during, and after a normal pregnancy: a longitudinal study. *Acta Obstet Gynecol Scand* **85**, 1299-1303. 2006.
150. Luo, H, Liang, X, Cheng, Z, Cai, X, Feng, F, Zhou, H, et al. Effects of normal pregnancy on maternal EEG, TCD, and cerebral cortical volume. *Brain Cogn* **140**, 105526. 2020.
151. Straszewski-Chavez, SL, Abrahams, VM, and Mor, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* **26**, 877-897. 2005.
152. De Falco, M, Penta, R, Laforgia, V, Cobellis, L, and De Luca, A. Apoptosis and human placenta: expression of proteins belonging to different apoptotic pathways during pregnancy. *J Exp Clin Cancer Res* **24**, 25-33. 2005.
153. Rogers, BB, Bloom, SL, and Leveno, KJ. Atherosclerosis revisited: current concepts on the pathophysiology of implantation site disorders. *Obstet Gynecol Surv* **54**, 189-195. 1999.
154. Bueno, J, and Pfaff, DW. Single unit recording in hypothalamus and preoptic area of estrogen-treated and untreated ovariectomized female rats. *Brain Res* **101**, 67-78. 1976.
155. Gould, E, Woolley, CS, Frankfurt, M, and McEwen, BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* **10**, 1286-1291. 1990.
156. Srivastava, DP, Woolfrey, KM, and Penzes, P. Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol Rev* **65**, 1318-1350. 2013.
157. Milner, TA, McEwen, BS, Hayashi, S, Li, CJ, Reagan, LP, and Alves, SE. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* **429**, 355-371. 2001.
158. Wang, AC, Hara, Y, Janssen, WG, Rapp, PR, and Morrison, JH. Synaptic estrogen receptor-alpha levels in prefrontal cortex in female rhesus monkeys and their correlation with cognitive performance. *J Neurosci* **30**, 12770-12776. 2010.

159. Acosta, JI, Hiroi, R, Camp, BW, Talboom, JS, and Bimonte-Nelson, HA. An update on the cognitive impact of clinically-used hormone therapies in the female rat: models, mazes, and mechanisms. *Brain Res* **1514**, 18-39. 2013.
160. Aimone, JB, Li, Y, Lee, SW, Clemenson, GD, Deng, W, and Gage, FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* **94**, 991-1026. 2014.
161. Leuner, B, and Gould, E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* **61**, 111-140, C111-113. 2010.
162. Tanapat, P, Hastings, NB, Reeves, AJ, and Gould, E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* **19**, 5792-5801. 1999.
163. Barha, CK, Lieblich, SE, and Galea, LA. Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neuroendocrinol* **21**, 155-166. 2009.
164. Araujo, APB, Carpi-Santos, R, and Gomes, FCA. The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum* **18**, 1017-1035. 2019.
165. Cekanaviciute, E, and Buckwalter, MS. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics* **13**, 685-701. 2016.
166. Hurwitz, AA, Berman, JW, Rashbaum, WK, and Lyman, WD. Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res* **625**, 238-243. 1993.
167. McCall, MA, Gregg, RG, Behringer, RR, Brenner, M, Delaney, CL, Galbreath, EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6361-6366. 1996.
168. Nowicka, D, Rogozinska, K, Aleksy, M, Witte, OW, and Skangiel-Kramska, J. Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **68**, 155-168. 2008.
169. Morioka, T, Kalehua, AN, and Streit, WJ. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol* **327**, 123-132. 1993.

170. Huang, L, Wu, ZB, Zhuge, Q, Zheng, W, Shao, B, Wang, B, et al. Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int J Med Sci* **11**, 344-348. 2014.
171. Dhandapani, KM, and Brann, DW. Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. *BMC Neurosci* **3**, 6. 2002.
172. Lopez Rodriguez, AB, Mateos Vicente, B, Romero-Zerbo, SY, Rodriguez-Rodriguez, N, Bellini, MJ, Rodriguez de Fonseca, F, et al. Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb Cortex* **21**, 2046-2055. 2011.
173. Hara, H, Harada, K, and Sukamoto, T. Chronological atrophy after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* **618**, 251-260. 1993.
174. Katchanov, J, Waeber, C, Gertz, K, Gietz, A, Winter, B, Bruck, W, et al. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* **13**, 452-464. 2003.
175. Pedrono, E, Durukan, A, Strbian, D, Marinkovic, I, Shekhar, S, Pitkonen, M, et al. An optimized mouse model for transient ischemic attack. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 188-195. 2010.
176. Hoekzema, E, Barba-Muller, E, Pozzobon, C, Picado, M, Lucco, F, Garcia-Garcia, D, et al. Pregnancy leads to long-lasting changes in human brain structure. *Nat Neurosci* **20**, 287-296. 2017.
177. Kim, P, Leckman, JF, Mayes, LC, Feldman, R, Wang, X, and Swain, JE. The plasticity of human maternal brain: longitudinal changes in brain anatomy during the early postpartum period. *Behav Neurosci* **124**, 695-700. 2010.

10.ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
27/11/2019	83		Dr. Öğr. Üye Ahmet Burak ÇAĞLAYAN

“Hamile Farelerde Serebral İskemi Sonrası Akut ve Kronik Dönemde Hasar Mekanizmalarının İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.12.2019 – 12 Ay

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

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlayda	Soyadı	KAYA
Doğum Yeri	Üsküdar/İstanbul	Doğum Tarihi	04.01.1996
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail	ilaydakyya@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018
Lise	KDZ. Ereğli Anadolu Lisesi	2014

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

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

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,48	71,02	72,82
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi

