



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN BEYİN İSKEMİ/
REPERFÜZYON HASARINDA PANNEKSİN-1
PROTEİNİNİN APOPTOZ VE NEKROPTOZ İLE İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

EMİNE ÇOLAK

DANIŞMAN

PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ

2020



T.C.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN BEYİN İSKEMİ/
REPERFÜZYON HASARINDA PANNEKSİN-1
PROTEİNİNİN APOPTOZ VE NEKROPTOZ İLE İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

EMİNE ÇOLAK

DANIŞMAN

PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ

2020

Proje No: ESOGÜ BAP 2018-1867

KABUL VE ONAY SAYFASI

Emine ÇOLAK'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı “**Deneysel Olarak Oluşturulan Beyin İskemi/ Reperfüzyon Hasarında Panneksin-1 Proteininin Apoptoz Ve Nekroptoz İle İlişkisi**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “**KABUL**” edilmiştir.

03/01/2020

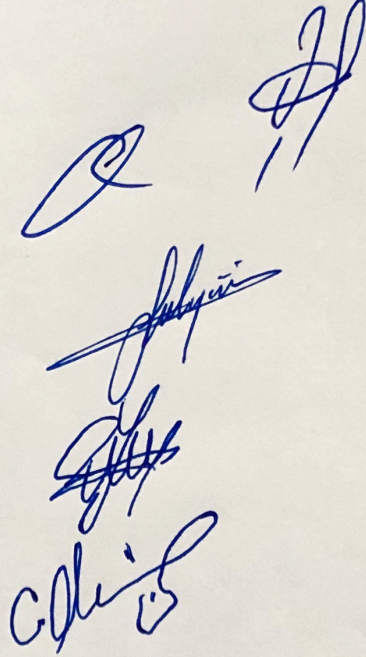
Üye : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye : Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR

Üye : Prof. Dr. Hülyam KURT

Üye : Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Üye : Doç. Dr. Cansu ÖZBAYER



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../ tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Özkan ALATAŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Bireylerde ölüme ya da kalıcı hasara sebep olabilen inme olgularının %85'i arteriyel tıkanma ya da yetersiz perfüzyon sonucunda oluşan iskemi kaynaklıdır. Beyinde iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon süreçleri eksitoksisite, periinfarkt depolarizasyon, inflamasyon, nitrik oksit üretimi, serbest radikal hasarı ve hücre ölümü olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerin tetiklenmesine sebep olur. Beyinde iskemi reperfüzyon (İ/R) süreçleri ekstrinsik yolak ve intrinsik olmak üzere iki apoptoz yolağını tetikler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarında nekroptozun da bu süreçte işlevsel olduğu ortaya konulmuştur.

Panneksin 1 (Pan1) proteinleri tarafından oluşturulan *Pan1* kanalları katyonlar, anyonlar ikincil mesajcılar ve metabolitler de dahil olmak üzere geniş bir geçirgenlik özgülüğüne sahiptir. Hücre farklılaşması, doku gelişimi ve rejenerasyonu, inflamasyon ve hücre ölümü gibi çeşitli patolojik süreçlerde görev alır. Beyin iskemi ve reperfüzyon sürecinde *Pan1* kanallarının açılması oksijen-glikoz yoksunluğu, hücreler arası alanda yüksek K⁺ konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. *Pan1* kanallarının açılması hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilecek hipoksik depolarizasyona neden olur.

Çalışmamızda, sıçanlarda sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak oluşturulan iki saat iskemi ve sonrasında kan akımının sağlandığı 24 saatlik reperfüzyon süreçlerinde pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* protein/kanal inhibitörü probenecid kullanarak, oluşan beyin İ/R hasarında *Pan1* proteinin apoptoz ve nekroptoz süreçlerindeki rolü araştırıldı. Yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen beyin dokusu örnekleri kullanılarak Paneksin1 kanallarının apoptoz ile ilişkisinin belirlenmesi için kaspaz 3, kaspaz 8, nekroptoz ile ilişkisinin belirlenmesi için RIP1, RIP3, MLKL gen ifadeleri ve protein düzeyleri belirlendi. Ayrıca bu yolaklarla ilişkili olan inflamasyon belirteci olan *TNF-α* ve DNA hasarı ve apoptoz belirleyicisi olan *PARP* protein düzeyleri belirlendi. Kaspaz 3, kaspaz 8,

RIPK3 ve MLKL antikoru kullanılarak immünohistokimyasal çalışmalar yapılarak protein düzeylerinin dokularda birikimi belirlendi. TTC boyama yapılarak İ/R hasarı makroskobik olarak değerlendirilirken, TUNEL yöntemi ile dokularda apoptoz oranları belirlendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, *Pan1* kanal/protein inhibitörü olan probenecidin iskemi reperfüzyon sürecinde apoptoz ile ilişkili olarak kaspaz 3 ve kaspaz 8 nekroptozla ilişkili olan RIP1, RIP3 ve MLKL gen ifadelerini ve protein düzeylerinin düşürdüğü belirlendi. Beyin İ/R hasarında Z-VAD-fmk, *TNF- α* düzeyinde önemli bir etki oluşturmadığı fakat probenecidin intraperitoneal uygulaması İ/R sürecinde artan *TNF- α* protein düzeyini azalttığı belirlendi. Ayrıca çalışmamızda beyin dokularında *TNF- α* protein düzeyini en etkili şekilde azaltarak İ/R hasarında oluşan inflamasyonu inhibe eden uygulamanın hem apoptoz inhibitörü hem de *Pan1* inhibitörünün birlikte uygulanması olduğu belirlendi. Yaptığımız çalışmada beyinde oluşturulan İ/R hasarında *PARP* protein düzeyini en etkili şekilde azaltan uygulamanın pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* protein/ kanal inhibitörü olan probenecidin birlikte uygulaması olduğu belirlenmiştir. TUNEL çalışmaları sonucunda *Pan1* kanallarını bloke eden probenecid uygulamasının beyin dokularında iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan apoptoz yüzdesini azalttığı fakat bu azaltışın Z-VAD-fmk uygulaması kadar etkili olmadığı belirlendi.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen beyin iskemi ve reperfüzyon sürecinde hem apoptotik hem nekroptotik hücrelerin görüldüğü, İ/R sürecinde oluşan hücre hasarlarını uygulanan pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk'nın bir dereceye kadar azaltırken *Pan1* protein/kanal inhibitörü olan probenecidin önemli düzeyde azaltarak reperfüzyon hasarında etkili bir terapötik ajan olduğu ve *Pan1* proteinlerinin İ/R hasarında önemli rol aldığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Beyin iskemi reperfüzyon, apoptoz, nekroptoz, panneksin 1

Summary

85% of stroke cases that can cause death or permanent damage in individuals are caused by ischemia due to arterial occlusion or insufficient perfusion. In the brain, ischemia and subsequent reperfusion processes trigger various pathophysiological processes including excitotoxicity, periinfarct depolarization, inflammation, nitric oxide production, free radical damage and cell death. Ischemia reperfusion (I/R) processes in the brain trigger two apoptosis pathways, the extrinsic pathway and the intrinsic pathway. Recent studies have shown that necroptosis is also functional in ischemia reperfusion injury.

Pannexin 1 (Pan1) channels formed by *Pan1* proteins have a wide permeability specificity including cations, anions, secondary messengers and metabolites. It is involved in various pathological processes such as cell differentiation, tissue development and regeneration, inflammation and cell death. Opening of *Pan1* channels in brain ischemia and reperfusion process is regulated by various factors such as oxygen-glucose deprivation, high K^+ concentration in the intercellular space. Opening of the *Pan1* channels leads to hypoxic depolarization, which can result in cell death.

In our study, two hours of ischemia with clamp insertion to the right arteria carotis communis and 24-hour reperfusion processes after blood flow were provided. Using pan caspase inhibitor Z-VAD-fmk and *Pan1* protein/channel inhibitor probenecid, the role of *Pan1* protein in brain I / R injury in apoptosis and necroptosis processes was investigated. To investigate the relationship between *Pan1* channels and apoptosis caspase 3, caspase 8 gene expressions and protein levels and the relationship between *Pan1* channels and necroptosis was evaluated by RIP1, RIP3, MLKL gene expressions and protein levels. In addition, *TNF- α* , as an inflammation marker and *PARP* for predictors of DNA damage and apoptosis were determined. The accumulation of protein levels in tissues was determined by immunohistochemical studies using caspase 3, caspase 8, RIPK3 and MLKL

antibodies. I/R damage was evaluated macroscopically by TTC staining and apoptosis rates were determined by TUNEL method.

As a result of the studies, it was determined that probenecid, which is a pan1 channel/protein inhibitor, decreases RIP1, RIP3, and MLKL gene expressions and protein levels associated with necroptosis and caspase 3 and caspase 8 gene expressions and protein levels associated with apoptosis in the ischemia-reperfusion process. It was also determined that Z-VAD-fmk did not have a significant effect on *TNF- α* in brain I/R injury but intraperitoneal administration of probenecid decreased *TNF- α* during I/R process. In addition, in our study, it was determined that the most effectively application that inhibited inflammation in I/R damage by decreasing TNF- α in brain tissues was the co-administration of apoptosis inhibitor and *Pan1* inhibitor. It was demonstrated that the application that most effective administration for reducing the level of PARP protein in the brain I/R damage is co-administration of pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk and *Pan1* protein/channel inhibitor probenecid. As a result of TUNEL studies, it was determined that probenecid administration blocking *Pan1* channels decreased the percentage of increased apoptosis in I/R process in brain tissues but this reduction was not as effective as Z-VAD-fmk administration.

In conclusion, we found that both apoptotic and necroptotic cells are seen in brain ischemia and reperfusion process, and while the pan caspase inhibitor Z-VAD-fmk was reduced to cell damage some degree; probenecid, a *Pan1* protein/channel inhibitor, is an effective therapeutic agent in reperfusion injury by significantly reducing cell damage. Our results demonstrated that *Pan1* proteins play an important role in I/R damage.

Keywords: Brain ischemia reperfusion, apoptosis, necroptosis, pannexin 1

İçindekiler

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnme	3
2.2. İskemik İnme	3
2.3. İskemi ve Reperfüzyon	4
2.3.1. İskemi.....	4
2.3.2. Reperfüzyon	5
2.3.3. Beyinde İ/R Hasarı Fizyopatolojisi	6
2.4. Hücre Ölümü	8
2.4.1. Apoptoz	9
2.4.2. Nekroptoz	11
2.4.3. İ/R Hasarı Sırasında Nekroptoz	14
2.5. Panneksin Ailesi ve Panneksin-1	14
2.5.1. Panneksin ailesi.....	14
2.5.2. Panneksin-1 Kanalları	16
2.6. Probenecid	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları	19
3.2. Deney Grupları	19
3.3. Cerrahi İşlemler	23
3.4. Beyin Enfarkt Hacminin Ölçümü	24
3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile Beyin Örneklerinde Gen İfadelerinin Belirlenmesi	26

3.5.1. Total RNA izolasyonu	26
3.5.2. Elde edilen RNA'lardan cDNA oluşturulması.....	28
3.5.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile gen ifadesi tayini.....	29
3.6. Beyin Dokularında Protein Düzeylerinin Ölçümü	30
3.6.1. Beyin dokusu örneklerinin hazırlanması	31
3.6.2. Standartların hazırlanması	31
3.6.3. Protein düzeylerinin ölçümü	32
3.7. Beyin Örneklerinden Histolojik Preparatların Hazırlanması.....	33
3.8. İmmünohistokimyasal Boyama.....	34
3.9. TUNEL Yöntemiyle Apoptozun Belirlenmesi	36
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi.....	40
4.2. Genlerin İfade Seviyeleri	43
4.2.1. Kaspaz 3 gen ifadesi	43
4.2.2. Kaspaz 8 gen ifadesi	46
4.2.3. RIP1 gen ifadesi.....	48
4.2.4. RIP3 gen ifadesi.....	51
4.2.5. MLKL gen ifadesi	53
4.3. Beyin Dokularında Protein Düzeyleri.....	56
4.3.1. Kaspaz 3 protein düzeyi	56
4.3.2. Kaspaz 8 protein düzeyi	58
4.3.3. RIPK1 protein düzeyi.....	61
4.2.4. RIPK3 protein düzeyi.....	63
4.2.5. MLKL protein düzeyi	65

4.2.6. TNF- α protein düzeyi	67
4.2.7. PARP protein düzeyi.....	69
4.4 Histoloji Bulguları.....	71
4.5 İmmünohistokimyasal Çalışma Bulguları.....	76
4.5.1 Kaspaz 3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama bulguları	76
4.5.2 Kaspaz 8 antikoruna ile İmmünohistokimyasal boyama sonuçları	79
4.5.3 RIPK3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama bulguları.....	82
4.5.4 MLKL antikoruna ile immünohistokimyasal boyama bulguları	85
4.6 TUNEL Bulguları	88
5. TARTIŞMA	91
5.1. TTC Boyama ile Belirlenen Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulgularının Değerlendirilmesi	93
5.2. RT-PCR ile Belirlenen Gen ifadelerinin Değerlendirilmesi	95
5.2.1. Kaspaz 3 gen ifadelerinin değerlendirilmesi	95
5.2.2. Kaspaz 8 gen ifadesinin değerlendirilmesi	98
5.2.3. RIP1 gen ifadesinin değerlendirilmesi	99
5.2.4. RIP3 gen ifadesi bulgularının değerlendirilmesi	103
5.2.5. MLKL gen ifadesi bulgularının değerlendirilmesi	105
5.3. Beyin Dokularında Protein Düzeylerinin Değerlendirilmesi	106
5.3.1. Kaspaz 3 protein düzeyinin değerlendirilmesi	106
5.3.2. Kaspaz 8 protein düzeyinin değerlendirilmesi	108
5.3.3. RIPK1 protein düzeyinin değerlendirilmesi	109
5.3.4. RIPK3 protein düzeyinin değerlendirilmesi	111
5.3.5. MLKL protein düzeyinin değerlendirilmesi	112
5.3.6. TNF- α protein düzeyinin değerlendirilmesi	114
5.3.7. PARP protein düzeyinin değerlendirilmesi.....	116

5.4. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi	118
5.5. İmmünohistokimyasal Çalışma Bulgularının Değerlendirilmesi	120
5.5.1. Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi	120
5.5.2. Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi	121
5.5.1. RIPK3 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi	121
5.5.4. MLKL antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi.....	122
5.6. TUNEL Bulgularının Değerlendirilmesi.....	122
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	125
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	129
Özgeçmiş	143

Tablo Dizini

Tablo 3.1 Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri	29
Tablo 3.2 Real Time PCR'da Kullanılan Primerler	29
Tablo 3.3 Real-time PCR koşulları.....	30
Tablo 3. 4 Kullanılan ELISA Kitlerinin Katalog Numaraları	30
Tablo 3. 5 Protein Seviyesi Ölçümünde Kullanılan Standart Solüsyonların Hazırlanması.	31
Tablo 3.6 Protein düzeyi ölçümünde kullanılan stok ve standart solüsyonların konsantrasyonları.	32
Tablo 4.1 Deney gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulguları.....	42
Tablo 4.2 Deney Gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzde Bulgularının Tukey Çoklu Karşılaştırma Testine Göre İkili Çoklu Karşılaştırılmaları	42
Tablo 4.3 Deney gruplarında kaspaz 3 gen ifadesinin karşılaştırılması.	44
Tablo 4.4 Kaspaz 3 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.....	45
Tablo 4.5 Deney gruplarında kaspaz 8 gen ifadelerinin karşılaştırılması.	47
Tablo 4.6 Kaspaz 8 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.....	47
Tablo 4.7 Deney gruplarında RIP1 gen ifadelerinin karşılaştırılması.	49
Tablo 4.8 RIP 1 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.	50
Tablo 4.9 Deney gruplarında RIP3 gen ifadelerinin karşılaştırılması.	52
Tablo 4.10 RIP 3 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.	52
Tablo 4.11 Deney gruplarında MLKL gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.12 MLKL gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.	55
Tablo 4.13 Deney gruplarında Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması.	57
Tablo 4.14 Kaspaz 3 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.	57
Tablo 4.15 Deney gruplarında Kaspaz 8 protein düzeylerinin karşılaştırılması.	59
Tablo 4.16 Kaspaz 8 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.	60

Tablo 4.17 Deney gruplarında RIPK1 protein düzeylerinin karşılaştırılması.	61
Tablo 4.18 RIPK1 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	62
Tablo 4.19 Deney gruplarında RIPK3 protein düzeylerinin karşılaştırılması.	64
Tablo 4.20 RIPK3 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	64
Tablo 4.21 Deney gruplarında MLKL protein düzeylerinin karşılaştırılması.	66
Tablo 4.22 MLKL protein düzeylerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	66
Tablo 4.23 Deney gruplarında TNF- α protein düzeylerinin karşılaştırılması.	68
Tablo 4.24 TNF- α protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	68
Tablo 4.25 Deney gruplarında PARP protein düzeylerinin karşılaştırılması.	70
Tablo 4.26 PARP protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	70
Tablo 4.27 Beyin doku örneklerinin H&E boyama yöntemi ile değerlendirilmesi (Grup içi)	73
Tablo 4.28 Beyin doku örneklerinin H&E boyama yöntemi ile değerlendirilmesi.....	74
Tablo 4.29 Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.	77
Tablo 4.30 Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.	80
Tablo 4.31 RIPK3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.	83
Tablo 4.32 MLKL antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.	86
Tablo 4.33 Deney gruplarında apoptoz yüzdesi.....	89
Tablo 4.34 Deney gruplarında apoptoz yüzdesinin Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.	89

Şekil Dizini

Şekil 3.1 Deney Grupları ve Uygulamaları.	22
Şekil 3.2 Cerrahi İşlemler.	23
Şekil 3. 3 Beyin Enfarkt Hacminin TTC ile Boyanması.	25
Şekil 3. 4 ImageJ ile Enfarkt Alanın Belirlenmesi.	26
Şekil 4.1 Beyin örneklerinde TTC Boyama Sonrasında Enfarkt Alanların Makroskobik Görüntüsü.....	41
Şekil 4.2 Deney gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulguları.	43
Şekil 4.3 Kaspaz 3 gen ifadeleri.	45
Şekil 4.4 Kaspaz 8 gen ifadeleri.	48
Şekil 4.5 RIP1 gen ifadeleri.	50
Şekil 4.6 RIP3 gen ifadeleri.	53
Şekil 4.7 MLKL gen ifadeleri.	55
Şekil 4.8 Kaspaz 3 protein düzeyleri.	58
Şekil 4.9 Kaspaz 8 protein düzeyleri.	60
Şekil 4.10 RIPK1 protein düzeyleri.	62
Şekil 4.11 RIPK3 protein düzeyleri.	65
Şekil 4.12 MLKL protein düzeyleri.....	67
Şekil4.13 TNF- α protein düzeyleri.....	69
Şekil 4.14 PARP protein düzeyleri.....	71
Şekil 4.15 Tüm deney gruplarına ait sıçan beyinlerinin ışık mikroskobik görüntüleri	75
Şekil 4.16 Kaspaz 3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.	78
Şekil 4.17 Kaspaz 8 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.	81
Şekil 4.18 RIPK3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.	84
Şeki 4.19 MLKL antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.	87
Şekil4.20 Deney gruplarında TUNEL boyama.....	90

Simge ve Kısaltmalar Dizini

SİMGE/KISALTMA	AÇIKLAMA
APAF-1	Apoptoz proteaz aktifleştirici faktör 1
APAF-1	Apoptoz proteaz aktifleştirici faktör 1
cIAP1	Hücrel apoptoz inhibitör protein 1
cIAP2	Hücrel apoptoz inhibitör protein 2
ELISA	Enzim bağı immün sorbent analizi
EV	Ekstrasellüler vezikül
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
FasR	Fas reseptörü
ICH modeli	İntraserebral kanama modeli
IL-1β	Interlökin-1 β
İ/R	İskemi/ Reperfüzyon
İ/R	İskemi reperfüzyon
MAPK	Mitogen-activated protein kinaz
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein Karışık soy kinaz bölgesi benzeri protein
NF-κB	Nekroz faktör kappa B
mPTP	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenekleri
NMDA	N-metil D-aspartat
OGD	Oksijen-glikoz mahrumiyeti
OSA	Orta serebral arter
<i>Pan1</i>	Panneksin 1
PARP	Poli-(ADP-riboz) polimeraz
PRR	Patojen tanıma reseptörleri
RIP1, RIPK1	Reseptör ilişkili protein1, Reseptör ilişkili protein kinaz 1
RIP3, RIPK3	Reseptör ilişkili protein 3, Reseptör ilişkili protein kinaz 3

ROT	Reaktif oksijen türleri
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TNFR1	Tümör nekroz faktör α reseptörü 1
TNFR1	Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı
TTC	2, 3, 5-trifenil tetrazolium klorür
Z-VAD-fmk	Karbonbenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]- florometilketon
$\Delta\Psi_m$	Mitokondri zar potansiyeli

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin iskemi reperfüzyonu oluşumunda indüklenen apoptoz yolları hücre ölüm sürecine yol açan başlıca yollardan birisidir. Aşırı apoptoz, nörodejeneratif hastalıkların ve iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarlarının özelliği olarak görülmektedir. İ/R'de ve dejenaratif hastalıklarda apoptoz oksidatif stres, eksitotoksisite, inflamasyon, mitokondriyal ve DNA hasarları tarafından tetiklenir. Ayrıca apoptozun çeşitli pan-kaspaz inhibitörleri tarafından bloke edilmesi, kaspaz 8 aktivasyonunu engelleyerek diğer bir hücre ölüm yolağı olan nekroptozu tetiklemekte ve yine doku hasarları oluşmaktadır. Apoptoz ve nekroptozun eşzamanlı inhibisyonunun beyin İ/R hasarı üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Fakat henüz bu konuda yapılan çalışmaların klinik bir olumlu sonucu elde edilememiştir.

Panneksin 1 (Pan1) proteinleri tarafından oluşturulan *panneksin 1* kanalları katyonlar, anyonlar ikincil mesajcılar ve metabolitler de dahil olmak üzere geniş bir geçirgenlik özgülüğüne sahip olup, hücre farklılaşması ve göçünün düzenlenmesi, doku gelişimi ve rejenerasyonu, inflamasyon, yara iyileşmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli patolojik süreçlerde görev alır (Boyd-Tressler, Penuela, Laird, & Dubyak, 2014; Maes et al., 2013; Makarenkova, Shah, & Shestopalov, 2018; Thompson, 2015). Beyin iskemi ve reperfüzyon sürecinde *panneksin* kanallarının açılması oksijen-glikoz yoksunluğu, hücreler arası alanda yüksek K⁺ konsantrasyonu, hipoglisemi, *NMDA* reseptörlerinin uyarımı gibi çeşitli faktörler tarafından indüklenir. Glikoz ve ATP gibi iyon ve moleküllere karşı geçirgen olan *panneksin 1* kanallarının açılması hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilecek hipoksik depolarizasyona neden olur (Thompson, 2015; K. Q. Zhou, Green, Bennet, Gunn, & Davidson, 2019). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda *panneksin-1* kanallarının nörotoksisitede etkili olduğu belirlenmiştir (Bargiotas et al., 2011; Dvorientchikova et al., 2012; Makarenkova et al., 2018). *Pan1* proteinlerinin/kanallarının bloke edilmesinin beyin İ/R hasarını çeşitli şekillerde azaltabileceği belirlenmiş fakat

bunların hücre ölüm yolları ve özellikle uzun süreçte ikincil bir inflamasyona yol açarak diğer hücrelerin kaybına sebep olabilecek olan nekroptozla ilişkisi belirsiz kalmıştır.

Biz de buradan hareket ederek sıçanlarda sağ arteria carotis communis'e klemptakarak oluşturduğumuz iki saatlik iskemi ve iskemiye takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde bir apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanarak deneysel olarak oluşturulan İ/R hasarında ölen hücrelerin nekroptoz ile ölüp ölmediğini diğer yandan bir kanal proteini olan *Pan1*'i inhibe eden probenecid kullanılarak, *Pan1* kanallarının İ/R hasarında tetiklenen ölüm yollarından apoptozu mu yoksa nekroptozu mu etkilediğini araştırdık.

Elde edilecek olan bilgilerin gelecekte hem inme hem de nörodejeneratif hastalıkların tedavi için hedef moleküllerin tanımlanmasında önemli bir basamak oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnme

İnme; beyini besleyen damarların farklı patolojik süreçler nedeniyle tıkanması veya daralması gibi çeşitli sebeplerden beyin arterlerindeki kan akışının azalması/engellenmesi sonucunda oksijen eksikliğinden kaynaklanan beyin hücrelerinin ani ölümü durumudur.

İnme demansa ve depresyona sebep olan heterojen bir hastalıktır olarak da tanımlanma olup, dünya genelinde serebrovasküler kazalar olarak nitelendirilmektedir (Amarenco, Bogousslavsky, Caplan, Donnan, & Hennerici, 2009; Johnson, Onuma, Owolabic, & Sachdeva, 2016). İnme, Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı çalışmalarda ölümün ikinci, engelliliğin ise üçüncü ana nedeni olarak belirlenmiş ve önemli bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmıştır (Johnson et al., 2016; Wang et al., 2015; L. Xu et al., 2015; Xingshun Xu et al., 2010).

İnme sonucunda kişilerin hayat kalitelerini olumsuz yönde etkileyen uzun süreli motor, algılama ve bilişsel hasarlar ortaya çıkmaktadır (Wang et al., 2015).

Etiyopatogenez temel alındığında inme iskemik, hemorajik, subaraknoid hemorajik, serebral venöz tromboz ve spinal kord inme olarak beş alt sınıfta incelenir (Amarenco et al., 2009).

2.2. İskemik İnme

Serebrovasküler hastalıklara bağlı inmelerin %85'lik kısmını kapsayan iskemik inme arteriyel tıkanma veya yetersiz perfüzyon basıncından kaynaklanır. Nöronlar için gerekli maddelerin girişlerinin engellenmesi ve toksik metabolitlerin ortamda birikmesi sonucunda dokuda yıkım hızlı gerçekleşir. Ayrıca hücreler gerekli olan iyon dengesini sağlayabilmek için sürekli olarak ATP'ye ihtiyaç

duyarlar. Bu nedenden dolayı beyin yüksek metabolizma hızına sahip bir organdır (Culman et al., 2012; Wang et al., 2015; Zivin, 1998).

Beyin iskemi modelleri inme patomekanizmalarının incelenmesinde kullanılan temel yöntemlerdir (Knapp et al., 2014). Yapılan deneysel hayvan modellerinden elde edilen olumlu sonuçlara rağmen, bugüne kadar klinik çalışmalarda beyin iskemisi sonrasında fonksiyonel geri kazanımı sağlayabilecek etkili bir tedavi henüz tanımlanmamıştır (Culman et al., 2012; Gupta & Briyal, 2004).

2.3. İskemi ve Reperfüzyon

2.3.1. İskemi

Bir organa gelen arteriyel/venöz kan akımının yetersiz hale gelmesi ya da tamamen kesilmesi olayına iskemi adı verilir. Hücre ve dokularda aerobik metabolizma devre dışı kalarak gerekli enerji anaerobik metabolizma yoluyla sağlanmaya çalışılır. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan toksik metabolitler doku perfüzyonu olmadığı için dokuda birikerek hücrelerin normal fonksiyonlarını kaybetmesine sebep olur. Hücrelerin fonksiyonlarını kaybetme derecesi iskeminin genişliği ve süresi ile belirlenir. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolarak hücrelölüm gerçekleşir.

Kan akımının kesintiye uğraması ile hücrelölüm fonksiyonların bozulmasına sebep olan ardışık kimyasal olaylar tetiklenir. Bu olaylar iskemik kaskad olarak isimlendirilir (De Groot & Rauen, 2007; Gupta & Briyal, 2004). Dokulara oksijenin yetersiz gelmesi ya da tamamen kesilmesi sonucunda hipoksi oluşur. Oksidatif fosforilasyon kaybı ile birlikte anaerobik glikoliz artar. Artan glikoliz sonucu hücre içi pH düşer ve adenozin 5'-trifosfat (ATP) gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılır. Ayrıca polizom yapılarında ribozomlar ayrılarak monozomların oluşumu başlar. Bu durum protein sentezinde azalmaya sebep olur. Na⁺-K⁺-ATPaz pompası inhibe olur. Hücre içine

Na⁺ iyonu ile birlikte su girişi gözlenir. Hücre içi Ca⁺² iyon konsantrasyonu artarak mitokondri zarının fonksiyonunu bozar. Artan Ca⁺² iyon konsantrasyonu hücre için sitotoksik etkiye sahip olan çeşitli proteazlar ile fosfolipaz A2'yi de aktive eder. Hücresel iskelette bozulma ve hücre zarı bütünlüğünün bozulması ile hücre ölümü gerçekleşir (De Groot & Rauen, 2007; Kerrigan & Stotland, 1993; Toklu, Deniz, Yüksel, Keyer-Uysal, & Şener, 2009).

2.3.2. Reperfüzyon

Dokuya veya organa gelen kan akımının bozulmasına neden olan etkenin ortadan kalkarak, tekrar kanlanmaya başlaması durumuna reperfüzyon denir. Reperfüzyon iskemik dokuda hasarın geri döndürülebilmesi, toksik metabolitlerin temizlenmesi ve hücresel bozuklukların düzeltilmesi için gerekli olmakla birlikte tehlikeli metabolik sonuçlara da neden olur (Kalogeris, Baines, Krenz, & Korthuis, 2012; Toklu et al., 2009). İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması ortamda artan oksijen ile birlikte serbest radikal türevlerinin üretimlerini arttırarak, enflamatuvar mediyatörler gibi çeşitli mekanizmalarda oluşan bir dizi değişikliklere sebep olarak bölgesel doku hasarını arttırabilir. Ayrıca oluşan toksik özellik gösterebilen metabolitlerin genel dolaşıma geçmesi sistemik hasarın genişlemesine sebep olabilir (Christophe & Nicolas, 2006; Sugawara et al., 2004). Bu nedenlerden dolayı iskemi/reperfüzyon sürecinde doku hasarının büyük bir bölümü reperfüzyon aşamasında oluşmaktadır.

Reperfüzyon hasarı hem hücre içinde hem de hücre dışında gerçekleşen çeşitli mekanizmaları içeren karmaşık bir süreçtir (Verzár & Szabados, 2011). İskemik dönemde aktive edilmiş olan Na⁺-H⁺ antiportu reperfüzyon süresince hücre içi yüksek Ca⁺² konsantrasyonuna sebep olmaya devam eder. Bunun sonucunda mitokondrinin iç zarında bulunan mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenekleri (mPTP) açılır. Bu durum yoğun hücre hasarı ve ölümden sorumludur (Halestrap, Clarke, & Javadov, 2004; Pantazi, Bejaoui, Folch-Puy, Adam, & Roselló-Catafau, 2016). İskemi süresince aksayan aerobik solunumun

engellenmesi ve bu durumu takip eden reperfüzyon sürecinde süper oksit, hidrojen peroksit ve reaktif nitrojen türevleri gibi reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde artış gözlenir. ROT'un çeşitli hücrel fonksiyonları üzerine zararlı etkileri gözlenmekle birlikte bağışıklık sistemini aktive edebilme özelliği de bulunmaktadır (Pantazi et al., 2016). Ayrıca reperfüzyona moleküler boyutta yanıt olarak *tümör nekroz faktör-a (TNF-a)* ve *interlökin-1 (IL-1)* gibi protein sentezi ile ilişkili transkripsiyonlar aktive edilerek enflamatuvar yanıt başlatılır. Makrofajlar, endotel hücreleri, nötrofiller, lenfositler, plateletler, parankimal hücreler, kompleman sistem, kan pıhtılaşma süreci, reaktif oksijen türevleri, nitrik oksit, pro-/anti-enflamatuvar sitokinler ve diğer mediyatörlerde bu enflamatuvar yanıt ile ilişkili olabilir ve mikrovasküler perfüzyonu engelleyebilirler (De Groot & Rauen, 2007).

İ/R hasarı oluşumu sürecinde organa özgü farklılıklar organ hasarının kapsamını, ciddiyeti ve geri döndürülebilirliğini etkiler (Kalogeris et al., 2012).

2.3.3. Beyinde İ/R Hasarı Fizyopatolojisi

Merkezi sinir sistemi serbest radikal hasarına oldukça hassastır. Beyinin yüksek oksijen tüketimi ve buna bağlı olarak da metabolizma hızının yüksek olması, kolayca okside olabilen zengin yağ asitlerini barındırması, sınırlı anaerobik metabolizma potansiyeli ve glikojen depoları ROT üretim miktarını arttırabilir. Buna karşılık düşük antioksidan sisteme sahip olması beyini serbest radikal hasarına karşı hassas bir hale getirmektedir (Kalogeris et al., 2012; Özgül & Nazıroğlu, 2010). Bu nedenlerden dolayı beyin, iskemik dayanıklılığı sınırlı olan bir organdır.

Serebral iskemik dokuda eksitoksisite, periinfarkt depolarizasyon, inflamasyon ve hücre ölümü olmak üzere dört temel biyokimyasal kaskad bulunmaktadır (De Groot & Rauen, 2007; Gupta & Briyal, 2004). İskemide nöronal fonksiyonu etkileyen temel faktör oksijen ve glikozun azalması nedeniyle ATP üretilmemesi ve sonucunda ATP seviyesinin azalmasıdır. Bu süreçte ATP-bağımlı

iyon pompaları etkinliklerini kaybederek hücre zarı depolarize olur. Hücre zarı yapısında oluşan bu hasar iyon gradiyentlerinin bozulmasına ve Ca^{+2} 'un hücre dışı ortamdaki hücre içine geçerek burada birikmesine sebep olur. Bu iyonik gradiyent dengesinin bozulması glutamati serbest hale getirir. Memeli beynindeki esas uyarımı arttırıcı ve hücrelerarası iletişimde anahtar bir nörotransmitter olan glutamatın normal şartlardaki hücre içi konsantrasyonu, hücrelerarası konsantrasyonundan daha yüksektir. İskemide nöronal zar depolarizasyonu glutamatın hücrelerarası konsantrasyonunun artmasına yol açar. Hücrelerarası glutamat artışı *N-metil D-aspartat (NMDA)* ve *non-NMDA* reseptörlerinin aktivasyonuna sebep olur. Eksitotoksiteden esas sorumlu olan *NMDA* reseptör aktivasyonudur. İskemik dokuda, *NMDA* reseptör kanallarının açılması nöron içine Na^+ , Cl^- 'un alınmasına sebep olur. Bu iyonların hücre içerisine girmesi ozmotik gradiyentte değişimi tetikleyerek nöronlarda su birikimi, nöronal şişme veya sitotoksik ödem oluşumu gerçekleşir. *NMDA* reseptör aktivasyonunun devam etmesi durumunda nöron içerisine Ca^{+2} girişi, Ca^{+2} bağımlı enzimler olan proteazların ve lipazların aktive olmasına neden olur. Beyinde doku hasarı başlayarak gecikmiş hücre ölümü gerçekleşir (Allen & Bayraktutan, 2009; Kalogeris et al., 2012; Macdonald & Stoodley, 1998). Beyin iskemisi ayrıca hasarlı alanı ve semptomların başlamasından günler sonra ilerleyen bir enflamatuvar reaksiyonu tetikler. İskemik dokuda ve çevresinde lökositler, sitokinler, kemokinler, interlökinler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli enflamatuvar mediyatörlerde artış gözlenir. Bu enflamatuvar reaksiyonların iskemik hasarın geç evrelerine katkıda bulunmakta ve nörolojik sonuçların kötüleşmesine neden olmaktadır (Huang, Upadhyay, & Tamargo, 2006; Iadecola & Alexander, 2001; Kalogeris et al., 2012).

İskemiye takip eden reperfüzyon ile serebral kan akışının yeniden başlaması düzenlenir. dokularda reperfüzyona bağlı olarak oksijen miktarının artışı nötrofil göçü, ROT artışı, beyinde ödem gibi çeşitli metabolik reaksiyonlara sebep olarak

beyin hasarının artmasına neden olur (Swanson, Ying, & Kauppinen, 2004). Doku hasarının oluşumunda reperfüze dokularda biriken nötrofiller aktif rol oynamaktadır. ROT ve lipit peroksitler nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlatmaktadır. Nötrofiller proteazlar ve elastazlar gibi salgıladıkları enzimler ile endotel hücre parçalanmasına sebep olarak, kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımına engel olan kapiller tıkaçların oluşmasına sebep olarak ya da salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör ile büyük damarlarda daralmaya neden olarak reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açarlar (Huang et al., 2006; Iadecola & Alexander, 2001). Beyinde oluşan iskemiye takip eden reperfüzyon dönemi ağır hasarın olduğu evre olup, bu evre öncesinde uygulanacak olan tedaviler sayesinde beyin hasarını önlemenin ya da azaltmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir (Bonaventura et al., 2016).

2.4. Hücre Ölümü

Hücre ölümü hem normal hem de patolojik özellik gösterebilen bir süreçtir. Hücre ölümü oluşan morfolojik görünüme (nekrotik, apoptotik, otofajik), enzimolojik kriterlere (*kaspazlar*, *katepsinler*, *PARP* gibi), fonksiyonel yönlerine (programlı/tesadüfi hücre ölümü, fizyolojik/patolojik hücre ölümü) ya da immünolojik özelliklerine göre sınıflandırılır (Galluzzi et al., 2018; Kim-Campbell, Gomez, & Bayir, 2019; Kroemer et al., 2009).

Apoptoz, otofaji ve nekroz hücre ölümü mekanizmalarının üç temel mekanizması olarak tanımlanır. Bunlar arasında bulunan nekroz genellikle tesadüfi ve düzensiz bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Ancak, yapılan yeni çalışmalar sonucunda nekrotik hücre ölümünün iyi düzenlenmiş çeşitli mekanizmalar ile gerçekleştirildiği belirlenerek bu hücre ölüm mekanizması nekroptoz olarak isimlendirilmiştir (Fayaz, Suvanish Kumar, & Rajanikant, 2014; Galluzzi et al., 2018; Smith & Yellon, 2011).

2.4.1. Apoptoz

Apoptoz sitoplazmada ön enzimler olarak bulunan kaspazlar ile yönetilmekte olup, aktive edildiklerinde hücrede apoptoza yol açan bir dizi proteolitik yolağın akışını başlatırlar. Apoptozu başlatan üç aktivasyon yolağı vardır: Ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolak, intrinsik (mitokondriyal) yolak ve granzim yolak (Halonen, 2016). Bu yolaklarda çeşitli kaspazlar görev almakla birlikte her üç yolakta da efektör *kaspaz 3*'ün aktivasyonu diğer efektör kaspazların (kaspaz 6 ve 7) aktivasyonu ile apoptoza neden olur (Güneş, 2014; Kam & Ferch, 2000).

Ekstrinsik yolak hücre zarı reseptörü olan *FAS* veya *TNF* reseptörlerine ilişkili ligandların bağlanması ile başlatılır. Üçlü yapı oluşturması ve *Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD)* ve *TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD)* olarak adlandırılan proteinler ilişkili reseptörlerle birleşir. *FADD* *kaspaz 8*'e bağlanabilmek ve kesilmek için gerekli iki ölüm efektör alanına sahiptir. *TRADD* bu efektör alanlarına sahip olmadığından dolayı *FADD* ile birleşerek *kaspaz 8*'i aktive eder. Aktif hale gelen *kaspaz 8*, *kaspaz 3*'ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar (Güneş, 2014; Kam & Ferch, 2000).

İntrinsik yolak stres, toksik reaktifler, UV ışını ve inflamasyon yoluyla tetiklenebilir. Mitokondri zar potansiyelindeki ($\Delta\Psi_m$) değişiklikler aracılığıyla aktive edilir. $\Delta\Psi_m$ değişiklikler mPTP'lerin açılması ve mitokondri iç zarında bulunan sitokrom c'nin sitozole translokasyonu ile sonuçlanmaktadır. *Sitokrom c apoptoz proteaz aktifleştirici faktör 1 (APAF-1)* bağlanarak, ATP varlığında *kaspaz 9*'u keserek aktifleştirir. *Kaspaz 9*, *kaspaz 3*'ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar. İntrinsik yolak dış mitokondriyal zarında yerleşik olan *Bcl-2* tarafından düzenlenir. *Bcl-2* ailesi üyelerinden *Bcl2* ve *Bcl-x* anti-apoptotik, *Bax* ve *Bad* pro-apoptotiktir (Gewies, 2003; Lawen, 2003).

Granzim aktivasyon yolu sitotoksik T lenfositleri ya da NK hücrelerin perforin salgılamasıyla uyarılır. Salgılanan perforin hedef hücre zarında porların oluşmasına ve sitoplazmadaki *kaspaz 10*'un aktive olmasını sağlar. Aktif *kaspaz*

*10 kaspaz 3*ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar (Halonen, 2016; Lawen, 2003).

Apoptozda mitokondriyal zar permeabilizasyonu, kromatin yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması ve sonuç olarak da çekirdeklerde büzüşme meydana gelir. Sitoplazma içinde parçalanmış çekirdek artıkları bulunan apoptotik cisimcikler oluşarak hücreden ayrılırlar. Apoptotik cisimcikler inflamasyon veya doku hasarı oluşturmadan komşu hücreler ve makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagosite edilir (Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio, & De Laurenzi, 2012; Gewies, 2003; Xuebo Xu, Lai, & Hua, 2019).

Hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormallikler kanser, AIDS, inme ve nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, Huntington ve amiyotropik yanal skleroz) gibi çeşitli hastalıkların önemli bir bileşenidir. Bu hastalıkların bir kısmı yetersiz apoptoz ile karakterize edilirken bir kısmı da aşırı apoptoz ile karakterize edilir. Örneğin, apoptoza direnç ve yetersiz apoptoz birçok kanser türünün karakterize özelliğidir. AIDS, miyelodisplastik sendromlar, toksin-(alkol) ile indüklenen karaciğer hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve İ/R hasarları (miyokart infarktı ve serebrovasküler atak-inme) gibi çeşitli durumlarda ise aşırı apoptoz görülmektedir (Halonen, 2016; Kam & Ferch, 2000; Misra, Rai, & Misra, 2016).

İskemik hasar ve hücre ölümü ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar hafif iskemik süreçlerin nekroz yerine apoptotik mekanizma ile hücre ölümünü indüklediğini gösterilmiştir. Fokal serebral iskemik inme oluşumundan kısa bir süre sonra kan akımının azalmasında en hızlı ve en çok etkilenen bölge beyin dokusunun merkezi olup iskemik/nekrotik kor olarak isimlendirilir. Bu bölge hızlı bir şekilde nekrotik hücre ölümüne uğrar. Bu nekrotik kor, kan akımının azalmasından etkilenerek fonksiyonları susturulan fakat metabolik olarak aktif olan, daha az ciddi şekilde etkilenen dokudan oluşan bir bölge ile çevrilidir. Bu bölge iskemik penumbra olarak isimlendirilir. İskemik penumbra veya periinfarkt bölgede daha hafif

hasarların oluşması ve hücrelerin ATP üretim yeteneklerini kaybetmemeleri nedeni ile bu bölgede birçok nöron birkaç saat veya gün sonra apoptoza girebilir (Broughton, Reutens, & Sobey, 2009; Doyle, Simon, & Stenzel-Poore, 2008; Kam & Ferch, 2000; Mehta, Manhas, & Raghubir, 2007).

2.4.2. Nekroptoz

Nekroptoz, *FAS* ve *TNFR* veya *patojen tanıma reseptörleri* (*PRR*'ler) dahil olmak üzere çeşitli ölüm reseptörleri tarafından tespit edilen, hücre dışı veya hücre içi mikro-ortamın bozulması ile başlatılan düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir (Galluzzi et al., 2018). Nekroptoz genellikle bakteriyel ve viral kaynaklı hücre içi enfeksiyonlara karşı bir savunma hattı olarak tanımlanmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle iskemi-reperfüzyon hasarlarında, iskemik inme, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda, miyokardiyal enfarktüs, ateroskleroz, pankreatit, enflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi çeşitli yaygın klinik hastalıklarda merkezi patofizyolojik öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Nekroptozun engellenmesi, bu hastalıklarda hücre yaşaya bilirliğini ve işlevlerini korumak için önemli bir terapötik strateji oluşturmaktadır (Fayaz et al., 2014; Linkermann & Green, 2014; T. Xie et al., 2013).

Moleküler düzeyde nekroptoz *ölüm reseptörleri* (*TNFR1*), *hücre yüzeyi Toll-benzeri reseptörler*, *DAI* ve diğer farklı sinyaller tarafından aktive edilir. Nekroptotik genler immün hücrelerde ve nöronal dokularda daha fazla ifade edilmektedir (Fayaz et al., 2014). Nekroptoz hücresel enerji üretiminin (ATP) inhibisyonu, hücre içi kalsiyum akışının düzensizliği, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve non-apoptotik proteazların aktivasyonu ile uyarılır (Fayaz et al., 2014; T. Liu, Bao, Wang, & Jiang, 2015).

Tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (*TNFR1*) ve Fas reseptörü (*FasR*) gibi ölüm reseptörlerinin ilgili ligandlar (*TNF- α* ve *FasL*) tarafından aktive edilmesi ve daha sonraki süreçte kaspaz-8 inhibisyonu ile nekroptoz görülmektedir.

TNF ile indüklenen nekroptoz en çok çalışılan nekroptoz yolağıdır. TNFR1' in ligandı tarafından uyarılması apoptoz (kaspazları içeren), nekroptoz (reseptör ilişkili protein kinaz 1 ve 3'e (RIP1 ve RIP3) bağılı olarak) ve NF-κB (sağ kalım ve enflamatuar tepkileri indükleme) olmak üzere üç farklı hücre yanıtını başlatabilir (Fayaz et al., 2014; Vandenabeele, Galluzzi, Berghe, & Kroemer, 2010; Vanlangenakker, Berghe, & Vandenabeele, 2012).

TNFR'nin aktivasyonu sonucunda, TNF reseptör ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) ile birleşir. TRADD'ın TNFR1 bağlanma aşaması kaspaz-8 bağımlı apoptozun başlaması, NF-κB'nin aktive edilmesi ve aynı zamanda nekroptozun engellenmesinde önemli bir adımdır (Fayaz et al., 2014).

RIP1 bu süreçler ile bağlantılı olan önemli bir proteindir. N-uç kinaz bölgesi, ara bölge ve C-uç ölüm bölgesi olmak üzere üç bölgeye sahiptir. RIP1, hücrel apoptoz inhibitör protein 1 ve 2 (cellular inhibitor of apoptosis protein; cIAP1 ve cIAP2) tarafından ara bölgede bulunan lizin 377'de ubikuitinasyona uğratılır. Oluşan RIP1-poliübikütin zinciri NF-κB temel düzenleyicisi olan NEMO'nun bağlanması için bir iskelet görevi yapar. NF-κB aktivasyonu için gerekli olan NEMO, IκB kinaz kompleksinin (IKK) düzenleyici alt birimdir. Bu süreçte RIP1, TRADD, *cIAP1/2* ve *NEMO* kompleks-1 olarak adlandırılan bir yapı oluştururlar. Böylece kompleks-1 'in oluşumu RIP1' in ubikuitinasyonuna ve *IKK* aktivasyonuna sebep olur. Aktifleşen *IKK* NF-κB'nin inhibitörü olan *IκB*'yi inaktive eder. Böylece *IκB* nin inaktivasyonu hücrenin yaşaması için gerekli olan NF-κB'nin aktivasyonuna neden olur (Fayaz et al., 2014; Vandenabeele et al., 2010).

TRADD'ın *TNFR1* e bağlanması apoptozu başlatan ve nekroptozu engelleyen *TRADD*, *Fas ilişkili ölüm bölgesi* (FADD), *RIP1* ve kaspaz-8 tarafından oluşturulan kompleks-IIa yapısının oluşmasını sağlar (Fayaz et al., 2014). FADD kaspaz-8'in kesime girmesini ve kaspaz-3 gibi etkili apoptotik proteinlerin aktifleşmesini sağlayarak apoptozu başlatırken RIP1 ve RIP3 aracılı nekroptozu inhibe eder (Vandenabeele et al., 2010).

CYLD geni NF- κ B'nin düzenlenmesine yardımcı olan proteinlerin üretilmesi için gerekli olan bilgiyi sağlar. NF- κ B bazı sinyallere yanıt olarak hücrelerin kendi kendini yok etmelerine (apoptoz) karşı korunmasına yardımcı olan proteinlerin bir grubudur. NF- κ B mekanizmasının düzenlenmesinde, CYLD proteinleri hücrenin anormal bir hale gelmesi gibi uygun durumlarda kendi kendini yok etme sinyallerine özgün yanıt vermesine izin verir. CYLD proteini bu mekanizma ile kontrolsüz bir şekilde büyüyen ve hızlı bölünen hücreleri engellemeye yardımcı olarak tümör baskılayıcı olarak hareket eder. CLYD proteini ubiquitin-protein bağlarını bozan bir enzimdir. cIAP1/2 tarafından ubiquitinlenmiş RIP1 CLYD'nin bağlanması ile bu yapıdan kurtulur. Böylece NEMO RIP1 arasında κ B aktive olamaz. RIP1'in CYLD tarafından deubikuitinasyonu RIP1'in RIP3'e bağlanmasına, kinaz aktiviteleriyle heterodimerize olmalarına ve nekrozom oluşumuna sebep olur (Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak, & Vandenabeele, 2014; Fayaz et al., 2014; Fulda, 2013; Vandenabeele et al., 2010). Nekrozom MLKL fosforilasyonuna ve konformasyonel değişimine sebep olur. Bu değişim sayesinde N-terminali ölüm efektör alanı serbest kalır. Bu şekilde aktif hale gelen ve oligomerleşen MLKL plazma zarlarına ve organellerine girmesine translokalize olur. MLKL'nin entegrasyonu, hücre zarı üzerinde por oluşumuna sebep olurken aynı zamanda enflamatuvar yapıda ve immün tepkileri ortaya çıkaran hasarla ilişkili moleküler yapıların (DAMP) salınmasına yol açar. MLKL aynı zamanda endozomlarla da ilişkilidir. Endositozlanmış proteinlerin taşınmasını kontrol ederek reseptörlerin ve ligandların bozulmasını arttırır, indüklenen sinyalleri modüle eder ve hücre dışı vezikül oluşumunu kolaylaştırır (Gong, Guy, Crawford, & Green, 2017; Lee & Kang, 2019; Weber, Roelandt, Bruggeman, Estornes, & Vandenabeele, 2018; Y. Xu et al., 2018; Yoon, Kovalenko, Bogdanov, & Wallach, 2017).

2.4.3. İ/R Hasarı Sırasında Nekroptoz

İ/R hasarında oksidatif stres ve apoptoz önemli katılımcılar olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda nekroptozun da bu süreçte işlevsel olduğu ortaya konulmuştur. mPTP'nin açılması sonucunda ROT üretimlerini arttırması, *poli ADP-riboz polymeraz (PARP)* aktivasyonunun katepsin gibi lizozomal enzimlerin salınımını tetiklemesi ve bunlar sonrasında inflamasyonun oluşması *TNF-α* ve FasL gibi sitokinlerin üretimine sebep olarak nekroptozu sebep olur. Glutamat eksitotoksitesi de bu yolağın aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (Fayaz et al., 2014).

Ayrıca aynı yolak üzerinden düzenlenmeleri nedeni ile reseptörlerin apoptoz ya da nekroptozu teşvik etmelerinin bir nedeni olarak da hücrelerdeki enerji seviyesi gösterilmektedir. Yüksek ATP seviyesi apoptoz yolağının teşvik ederken, düşük ATP seviyesinin nekroptozu teşvik ettiği ileri sürülmektedir (Degterev et al., 2005; Halonen, 2016). Nekroptozun, ATP düzeylerinin azalması ve Ca^{+2} düzeylerinin artışı ile ortaya çıktığı, Ca^{+2} artışının kalpainleri aktive ederek lizozomal parçalanmaya, katepsinler gibi protezların aktivasyonuna ve salınımına yol açarak hücrenin yok edildiği bildirilmiştir (T. Xie et al., 2013).

2.5. Panneksin Ailesi ve *Panneksin-1*

2.5.1. *Panneksin* ailesi

Panneksin protein ailesi ilk olarak 2000 yılında Panchina ve arkadaşları tarafından konneksinlerle aynı topolojiye sahip olduğu öngörülen ikinci bir gap junction proteinleri olarak tanımlandı (Panchina et al., 2000). Panneksinlerin tanımlanmasında inneksinler ile %20 dizi homolojisine sahip olmaları önemli rol oynamıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar, panneksinlerin omurgalıların hemen hemen tüm dokularda ifade edilen ve özellikle de merkezi sinir sisteminde daha fazla bulunan kanal proteinleri olduklarını göstermiştir (Baranova et al., 2004). Panneksin ailesi *panneksin-1 (Pan1)*, *panneksin-2 (Pan2)* ve *panneksin-3 (Pan3)*

olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (Bosco, Haefliger, & Meda, 2011; Panchina et al., 2000; Penuela, Gehi, & Laird, 2013). *Pan1* iskelet ve kalp kası, testis, yumurtalık, sinir ve bağışıklık sistemleri, göz, kas, koku epiteli, kan damarları, ekzokrin bezleri, tiroit, prostat, böbrek ve karaciğer de dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücre tiplerinde, *Pan2* temel olarak merkezi sinir sisteminde ve düşük miktarda testis, böbrek, retina ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere sinir dışı doku hücrelerinde, *Pan3* çeşitli embriyonik dokularda, yetişkin iskelet kası, meme bezleri, yağ bezleri, ince bağırsak kemik, cilt ve kıkırdak doku hücrelerinde ifade edilir (Makarenkova et al., 2018; Sosinsky et al., 2011).

Panneksinler iki ekstrasellüler ilmekle dört transmembran alana sahip integral zar proteinleridir. *Panneksin* proteinleri iki ekstrasellüler sisteme sahiptir ve ikinci ekstrasellüler ilmeklerinde Asn254 bölgesinde glikozilasyon için dizilere sahiptir. *Panneksin* kanallarının oluşumunda altı tane *panneksin 1 protein* monomerinin bir araya gelmesi ile *panneksin 1 protein* kanalları, yedi ya da sekiz tane *panneksin 2* monomerinin bir araya gelmesi ile *panneksin 2 protein* kanalları ve altı tane *panneksin 3* monomerinin bir araya gelmesi ile *panneksin 3 protein* kanalı oluşur (Bosco et al., 2011; Penuela et al., 2013; Sosinsky et al., 2011; Taylor, Wright, & Mahaut-Smith, 2015).

Panneksin kanalları katyonlar, anyonlar ikincil mesajcılar ve metabolitler de dahil olmak üzere geniş bir geçirgenlik özgüllüğüne sahiptir (Thompson, 2015). *Panneksin* yoluyla düzenlenen ATP salınımı, normal fizyolojik fonksiyonlarla ya da hücrelerdeki stres ya da patolojik durumlara cevap olarak ortaya çıkar (Boyd-Tressler et al., 2014). *Panneksin* kanal proteinleri ayrıca hücre farklılaşması ve göçünün düzenlenmesi, doku gelişimi ve rejenerasyonu, inflamasyon, yara iyileşmesi ve hücre ölümü gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol alır (Maes et al., 2013; Makarenkova et al., 2018).

2.5.2. Panneksin-1 Kanalları

Pan1 kanalları insanlarda hemen hemen tüm dokularda yer almaktadır (Y. Kim et al., 2017; Taylor et al., 2015; Thompson, 2015). *Pan1 kanalları* hücrenin dinlenme durumunda genellikle kapalı halde bulunur. Hücre zarı potansiyelinin yüksek voltaj ve hücre dışı potasyum tarafından depolarizasyonu, mekanik uyarılar, karboksil ucunun efektör kaspazlar ile kesimi, sitoplazmik Ca^{+2} miktarındaki artış ve hücre dışı ATP ile aktive edilir. Bu kanalların aktivasyonu hücre dışı çevre ile çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesi için hücresel iletişime izin verir (Boyd-Tressler et al., 2014; Scemes & Velíšková, 2017).

Pan1 kanalları mikofilamanlar ile etkileşime girer. Bu nedenden dolayı hücre zarı üzerinde rahat bir şekilde hareket edebilir. Potasyum kanal alt ünitesi olan $Kv\beta3'$ ün *Pan1* kanalının potansiyel bağlanma ortağı olduğu gösterilmiştir. *Pan1* kanalları aynı zamanda birçok inflamasyon bileşeni ile birleşmektedir (Jackson, 2015; Penuela et al., 2013). *Pan1* kanallarının diğer bir bağlanma eşi *P2X* pürinoseptörleridir. Pürinerjik reseptörler ve *Pan1* kanalları sinir sistemi, immün dokular ve nöro-endokrin hücreleri olmak üzere çok çeşitli dokularda birlikte ifade edilir (S. Li, Bjelobaba, & Stojilkovic, 2018). Fizyolojik durumlarda, *P2X* reseptörü (*P2XR*) kanalları ve *N-metil-D-aspartat* (*NMDA*) reseptörü (*NMDAR*) kanalları, *Pan1 kanalını* kontrol eder. Ayrıca, kalsiyum mobilize edici *P2Y* reseptörlerinin (*P2YR*) hücre dışı adenozin 5'-trifosfat (ATP) ile aktivasyonu, trombinin uyardığı proteaz- aktive reseptörleri ve fibroblast büyüme faktörü reseptörleri, *Pan1* kanal fonksiyonlarını düzenler. Adipositlerdeki insülin reseptörlerinin aktivasyonu, glikoz alımını kolaylaştıran *Pan1* kanallarının açılmasını sağlar.

Apoptotik hücrelerde *Pan1* kanallarını karboksil ucunun efektör kaspazlar ile proteolizinin bu kanalları aktive ettiği ve özellikle apoptoz sırasında aktif kaspaz-3 birikiminin *Pan1* kanallarının geri dönüşümsüz olarak açılmasına neden olduğu belirlenmiştir. *Pan1* kanallarının kaspazlar tarafından aktivasyonu bu

kanallardan ATP ve UTP'nin hücreler arası alana salınmasına sebep olurken, bu alanda biriken yapılar apoptoza giden hücrelerin fagositler tarafından yok edilmesinin sağlanması için gerekli sinyalleri oluşturur ((Boyd-Tressler et al., 2014; Orellana et al., 2009; Sandilos et al., 2012; Scemes & Velišková, 2017; Shestopalov & Slepak, 2014)

Sinir sisteminde oluşan iskemik koşullarda, *NMDAR*'ların *Pan1* kanallarını aktive etmesi, kontrolsüz *glutamat* salınımına ve lezyon bölgesinde Ca^{+2} 'nin aşırı artmasına neden olarak eksitotoksisite oluşur (Y. Kim et al., 2017; S. Li et al., 2018; Maes et al., 2013; Penuela et al., 2013). *P2X* reseptörü (*P2XR*) kanalları ile *Pan1* kanallarının oluşturduğu kompleks nöronal hücrelerde yalnızca ATP'nin dışarı salınmasını değil aynı zamanda çeşitli enzimatik yolları da aktive eder. İlk olarak ROT üretiminden sorumlu olan *NADPH* oksidazın aktivasyonu sağlar. İkincil mekanizma ile bu kompleksin aşırı aktivasyonu inflamasyonun aktivasyonunu sağlar (Y. Kim et al., 2017; Shestopalov & Slepak, 2014; Thompson, 2015).

Pan1 protein/kanallarının fonksiyonları mimetik peptitler ve karbenoksolon, probenecid ve flufenamik asit gibi kanal inhibitörleri ile ortadan kalkar (Penuela et al., 2013).

2.6. Probenecid

Pan1 proteinlerini ve dolayısı ile de *Pan1* kanallarının inhibisyonu için çeşitli bileşiklerle çalışmalar yapılmıştır. Fakat bu bileşiklerin konneksinler dahil olmak üzere diğer kanalları da bloke edebildikleri bu yüzden de *Pan1* kanalları için seçici olmadıkları belirlenmiştir (Y. Kim et al., 2017; Shestopalov & Slepak, 2014). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, probenecidin ($IC_{50} \sim 150 \mu M$) 5 mM'ye kadar yüksek dozlarda bile konneksin kanallarını etkilemeden *Pan1* 'i inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Bond & Naus, 2014; Y. Kim et al., 2017; W. R. Silverman et al., 2009).

Probenecid, günümüzde gut tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir ilaç olup aynı zamanda klinik olarak antibiyotiklerin, kemoterapötiklerin ve diğer ilaçların etkin konsantrasyonlarını artırmak için de kullanılmaktadır (Shestopalov & Slepak, 2014; Willebrords, Maes, Yanguas, & Vincken, 2017). Campos-Arroyo ve arkadaşlarının nöroblastom kanser kök hücreleri ile yaptıkları çalışmada probenecidin nöroblastom hücrelerini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak cisplatinin etkilerine karşı duyarlılaştırdığı ileri sürülmüştür (Campos-Arroyo et al., 2016).

Yapılan çeşitli çalışmalarda *Pan1 kanallarını* inhibe eden probenecidin, beyin iskemisi modellerinde hasar derecesini azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda farelerde akut tübuler nekrozda, sıçanlarda beyin İ/R hasarında ve neokortikal fare astrositlerinde oksijen/glikoz yoksunluğu sonucu oluşan hasarlarda probenecidin reperfüzyon öncesinde uygulanmasının lizozomal ve inflamazomal yolları düzenlediği ve bu nedenden dolayı hasarı önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Baudoux et al., 2012; Jian et al., 2016; R. Wei et al., 2015; Willebrords et al., 2017). Yapılan çalışmalarda probenecidin hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda düşük toksisitesi nedeni ile kullanılabilirliği belirtilmiştir (Campos-Arroyo et al., 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 02.02.2017_107/573 sayılı izni ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nde deneysel aşamaları tamamlandı. Deneysel aşama sonunda elde edilen dokular ile çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, histolojik çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. TUNEL yöntemiyle apoptozun belirlenmesinde son aşama olan floresan mikroskopu ile görüntüleme ESOGÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ARUM)' yapıldı.

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 2018-1867 no'lu ve Deneysel Olarak Oluşturulan Beyin İskemi/Reperfüzyon Hasarında Panneksin-1 Proteininin Apoptoz ve Nekroptoz İle İlişkisi başlıklı projesi tarafından desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Çalışmada 360.08 ± 24.25 gr. ağırlığında Wistar cinsi albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngü içerisinde, ad libidum beslenerek, sıcaklığı sabit tutulan ($21^\circ \pm 3^\circ\text{C}$) hayvan saklama odalarında tutuldu. Deney süreçlerinde tüm sıçanlar polikarbon şeffaf kafeslerde tek tek barındırıldı.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan deney hayvanları KOBAY AŞ (Ankara, Türkiye)'den temin edildi. Tüm deneysel aşamalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

1X'lik PBS tamponu 100 ml distile su içerisinde 1 adet PBS (Bio Basic Inc., Kanada, Katalog no: PD0435) tableti konularak hazırlandı. Pan-kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk (Cayman Chemical Company, Michigan, ABD, Katalog no: 14463)

1,5 mg/kg konsantrasyonunda olacak şekilde 1X'lik PBS tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlandı. *Pan1* kanalı inhibitörü olan probenecid (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Teksas, ABD, Katalog no: 202773) hazırlanan 1X'lik PBS tamponu ile çözülerek denek başına 1 mg/kg konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlandı.

Rastgele seçimle her biri 12 sıçandan oluşan 6 grup deney başlangıcından bir hafta önce oluşturuldu (**Şekil 3.1**).

Kontrol grubu (K Grubu): Deneklere herhangi bir beyin iskemisi ile ilgili uygulama yapılmadı ve tedavi edici bir madde uygulanmadı. Hayvanlar traş edilerek boyun ön bölgelerinde, servikal orta hatta yaklaşık 2 cm kadar vertikal insizyonla açıldı. Birinci ve 6. saatlerde karın içine (intraperitoneal, ip) 1X'lik PBS uygulandı. 24 saat sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

İskemi Kontrol Grubu (İK Grubu): Sağ arteria carotis communis'a ulaşıp, klemplenerek 2 saat kan akışı engellendi. Bu işlemin 1. saatinde intraperitoneal olarak 1X'lik PBS uygulandı. İki saat sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

İ/R kontrol grubu (İRK grubu): Sağ arteria carotis communis'a ulaşıp, klemplenerek 2 saat kan akışı engellendi. İki saatlik iskemi sonunda, klempler çıkartılarak kan akışının devamı sağlandı. İskemi aşamasının 1. saatinde ve reperfüzyon aşamasının 5. saatinde intraperitoneal olarak 1X'lik PBS uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

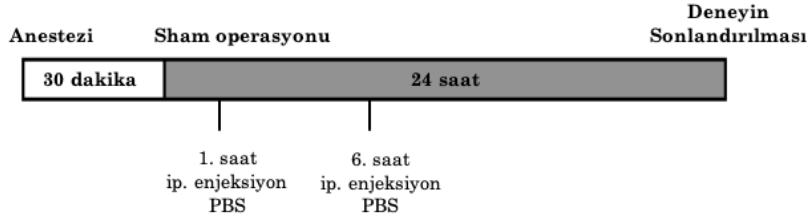
İ/R + apoptoz inhibitör grubu (ZVAD Grubu): Sağ arteria carotis communis'a ulaşıp, klemplenerek 2 saat kan akışı engellendi. İki saatlik iskemi sonunda, klempler çıkartılarak kan akışının devamı sağlandı. İskemi aşamasının 1. saatinde ve reperfüzyon aşamasının 5. saatinde intraperitoneal olarak **apoptoz inhibitörü**

olan Z-VAD-fmk (1,5 mg/kg) uygulaması yapıldı. 24 saatlik reperfüzyon sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

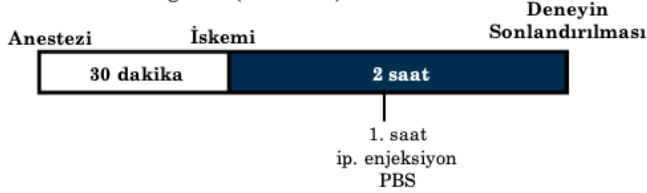
İ/R + panneksin-1 inhibitör grubu (PRB Grubu): Sağ arteria carotis communis'a ulaşıp, klemlenerek 2 saat kan akışı engellendi. İki saatlik iskemi sonunda, klemler çıkartılarak kan akışının devamı sağlandı. İskemi aşamasının 1. saatinde ve reperfüzyon aşamasının 5. saatinde intraperitoneal olarak **Pan1 inhibitörü olan probenecid** (1 mg/kg) uygulaması yapıldı. 24 saatlik reperfüzyon sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

İ/R + apoptoz inhibitörü + panneksin-1 inhibitör grubu (ZP Grubu): Sağ arteria carotis communis'a ulaşıp, klemlenerek 2 saat kan akışı engellendi. İki saatlik iskemi sonunda, klemler çıkartılarak kan akışının devamı sağlandı. İskemi aşamasının 1. saatinde ve reperfüzyon aşamasının 5. saatinde intraperitoneal olarak **apoptoz inhibitörü (Z-VAD-fmk, 1,5 mg/kg)** ve **Pan1 inhibitörü (probenecid, 1 mg/kg)** birlikte uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

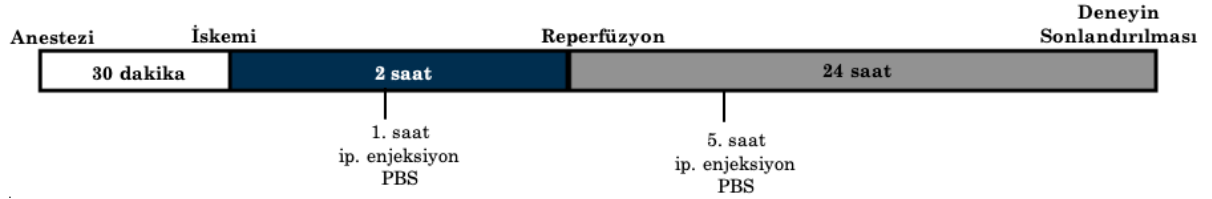
Kontrol Grubu (K Grubu)



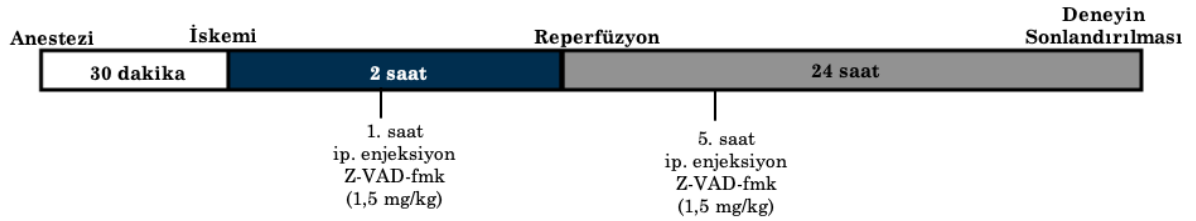
İskemi Kontrol grubu (İK Grubu)



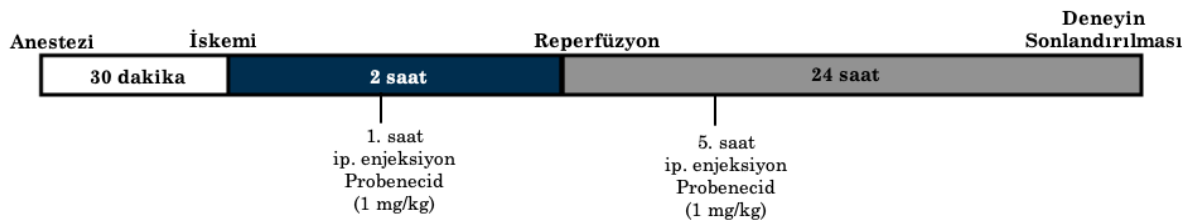
İskemi Reperfüzyon Kontrol Grubu (İRK Grubu)



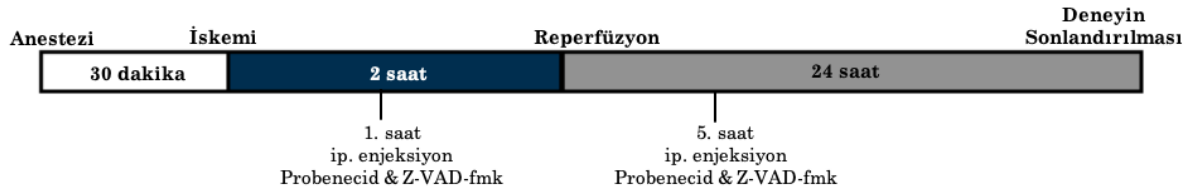
İ/R + apoptoz inhibitör grubu (ZVAD Grubu)



İ/R + panneksin inhibitör grubu (PRB Grubu)



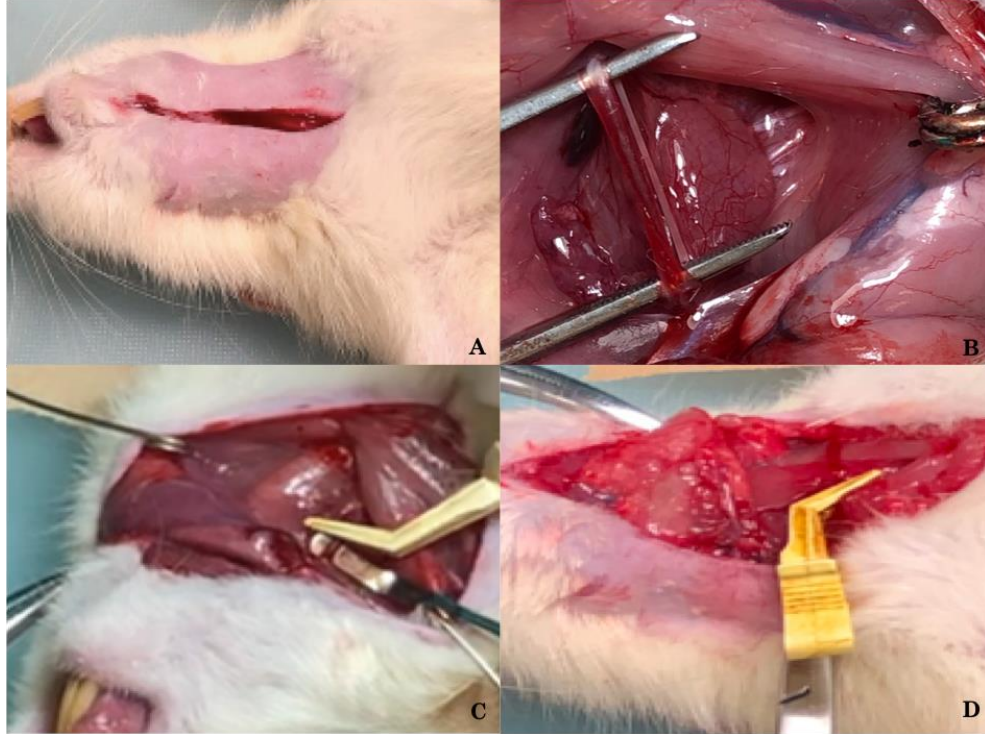
İ/R + apoptoz inhibitörü + panneksin-1 inhibitör grubu (ZP Grubu)



Şekil 3.1 Deney Grupları ve Uygulamaları.

3.3. Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlemlerden önce hassas terazide tartılan deney hayvanlarına ağırlıklarına uygun olarak intramüsküler enjeksiyonla ketamin HCl (30 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) ile anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki sıçanlar sırt üstü pozisyonda yatırılarak el ve ayaklarından cerrahi girişim tahtasına sabitlendi. Ön boyun bölgelerindeki tüyler tıraşlanarak bölge antiseptik %10'luk povidon iyodür solüsyonu ile silindi. Hayvanların boyun ön bölgelerinde servikal orta hat yaklaşık 2 cm kadar vertikal insizyonla açıldı (**Şekil 3.2, A**). Unilateral olarak sağ arteria carotis communis'e ulaşıldı ve nervus vagusdan izole edildi (**Şekil 3.2, B**). İzole edilen sağ arteria carotis communis'e klemp (Vascu Stop Bulldog Clamp, İstanbul, Türkiye) takılarak iskemi süreci başlatıldı (Serra et al., 2019) (**Şekil 3.2, C-D**).



Şekil 3.2 Cerrahi İşlemler.

Deney gruplarından İK, İRK, ZVAD, PRB ve ZP gruplarında izole edilen sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak iki saat boyunca iskemi oluşması sağlandı. İK grubunda bulunan sıçanlar iki saatlik iskemi sonrasında anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

İRK, ZVAD, PRB ve ZP gruplarında iki saatin sonrasında klemler açılarak reperfüzyon sağlandı. Kesi bölgesi steril koşullarda sütur ile dikilerek kapatılarak antiseptik solüsyon ile silindi.

İskeminin başlangıcına göre; ZVAD, PRB ve ZP gruplarında Şekil 3.1'de belirtilen maddeler 1. ve 6. saatte karın içine (intraperitoneal, *ip*) olarak uygulandı. Yirmi dört saatlik reperfüzyon süreci boyunca her bir denek TİCAM post-opere odalarında ayrı kafeslerde barındırıldı. Reperfüzyon süreçleri tamamlanan sıçanlar anestezi altında sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri alındı.

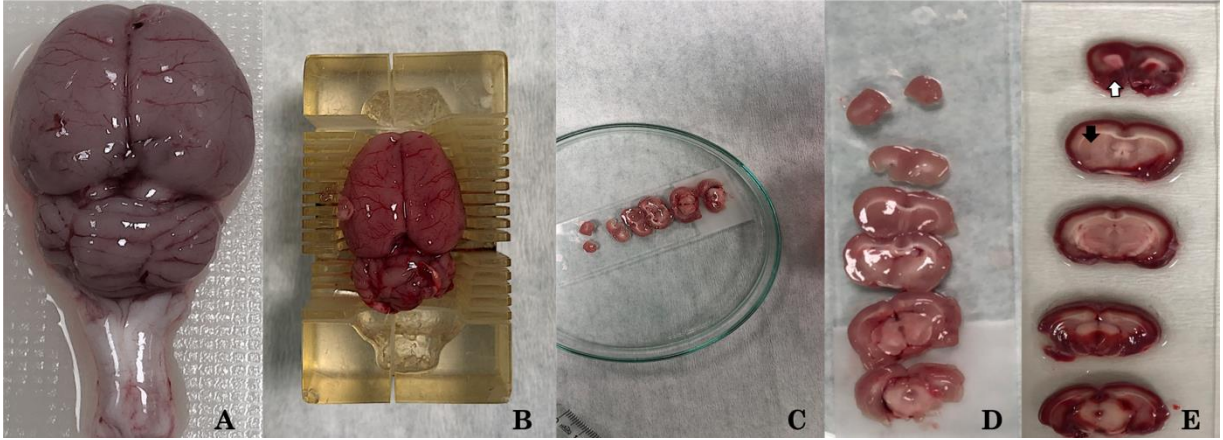
Her gruptan iki deney hayvanının beyin örnekleri TTC ile boyanırken, diğer beyin örnekleri ikiye ayrıldı. Histolojik çalışmalar için kullanılacak olan örnekler formaldehite konulurken, protein seviyelerinin ve gen ifadelerinin ölçümü için kullanılacak olan tüm örnekler sıvı azot ile hızlı bir şekilde dondurularak -80°C'de muhafaza edildi.

3.4. Beyin Enfarkt Hacminin Ölçümü

2-3-5-trifenil tetrazolium klorür (TTC) beyaz kristal yapıda, dehidrogenazların substratı olan bir redoks indikatörüdür. TTC genellikle canlı ve cansız döluların ayırımının yapılmasında kullanılır. Normal şartlarda beyaz renkte olan TTC, canlı dokularda farklı dehidrogenazların aktivitesi sayesinde kırmızı renkte olan 1,3,5-triphenylformazan'a indirgenerek dokunun kırmızı olarak görüntülenmesini sağlar. Canlılık faaliyetlerini kaybetmiş dokularda dehidrogenaz enzimlerinin bozulmasından dolayı TTC indirgenmez ve doku boyanmaz (Isayama, Pitts, & Nishimura, 1991; F. Zhang & Chen, 2012).

Çalışmada enfarkt alanların yerinin ve kapsamının belirlenebilmesi için deneysel uygulamalar sonunda her bir gruptan iki deney hayvanının beyin dokuları alınarak TTC boyaması yapıldı.

- Anestezi altında sakrifiye edilen deneklerin beyinleri çıkartılarak, hızlı bir şekilde koronal dilimler (2mm) hazırlandı (Şekil 3.3, A-B).
- Bu dilimler PBS ile hazırlanan %2'lik TTC (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, ABD, kat no: 17342) bulunan petri kabına alınarak, 37°C de 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi (Şekil 3.3, C-D).
- Bu süreçte dokuların TTC'ye homojen olarak maruz kalabilmeleri için dilimlerin hafifçe karıştırılması sağlandı.



Şekil 3. 3 Beyin Enfarkt Hacminin TTC ile Boyanması.

- TTC boyama sonucunda normal beyin dokusu kırmızı renge boyanırken (Şekil 3.3, E, beyaz ok) iskemik dokular soluk pembe veya kirli beyaz renkte (Şekil 3.3, E, siyah ok) gözlendi.
- Elde edilen görüntülerin fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına alındı. Enfarkt alanların ölçümünde ImageJ analyzer programı (1.52k, National Institutes of Health, ABD, Wayne Rasband) kullanıldı (Şekil 3.4).
- Her dilimdeki enfarkt hacim, enfarkt alan toplamının dilim kalınlığı (2mm) ile çarpılmasıyla hesaplandı. % Enfarkt hacim = (dokularda TTC ile

boyanmayan enfarkt dokuların hacmi/ tüm hacim) x100 şeklinde hesaplandı (Nikseresht, Khodagholi, & Ahmadiani, 2019; Yan et al., 2017; F. Zhang & Chen, 2012).



Şekil 3. 4 ImageJ ile Enfarkt Alanın Belirlenmesi.

3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile Beyin Örneklerinde Gen İfadelerinin Belirlenmesi

3.5.1. Total RNA izolasyonu

DeneySEL uygulamalar sonucunda elde edilen beyin dokuları hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurularak çalışma yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi NucleoSpin® RNA Midi, (MACHEREY-NAGEL Düren, Almanya, Kat no: 740955.50) kiti kullanıldı. Beyin dokusundan RNA izolasyonunun zor olması nedeni ile RNA verimi ve kalitesini geliştirmek amacıyla kit yöntemi destek protokolü kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışma prosedürü:

- -80°C'de bulunan sıçan beyin dokularından 20 mg örnek alınarak 1.5 mL'lik tüplere konuldu.
- Her bir örneğe 400 µL RA1 Tamponu eklendi ve doku buz içerisinde ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildi.
- 5 dakika 14000 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant 1.5 mL'lik yeni tüplere dikkatlice aktarıldı.

- Örneklere 300 µL etanol (%100) eklendi ve vorteksenerek iyice karıştırıldı.
- Tüpler 10 dakika 14,000 x g'de santrifüj edilerek oluşan süpernatant atıldı.

Bu aşamalardan sonraki izolasyon çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

- Etanolün uzaklaştırılması için 5 dakika beklenildi.
- Peletlere 25 µL RNaz içermeyen su eklendi ve tamamen süspanse edildi.
- 375 µL Tampon RA1 eklenip, pipetlendi ve hafifçe vorteksenerek karıştırıldı.
- Homojenize lizata 350 µL etanol (%70) eklendi ve yavaşça 5 kez pipetlenerek karıştırıldı.
- Her örnek için toplama tüpüne NucleoSpin® RNA Sütunu yerleştirildi. Lizat 2-3 kez yukarı-aşağı pipetlenerek kolona yüklendi.
- 11000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Sütunlar 2 mL'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- 350 µL MDB (Membran Desalting Tampon) eklenerek membranların kuruması için 1 dakika boyunca 11,000 x g'de santrifüjlendi.
- Steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde 90 µL Reaksiyon Tamponuna 10 µL sulandırılmış rDNase eklenerek DNase reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan rDNase reaksiyon karışımı doğrudan kolonun silika zarının ortasına 95 µL olacak şekilde uygulanarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- NucleoSpin® RNA Kolonuna 200 µL Tampon RAW2 eklenerek 11000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.
- Kolonlar yeni toplama tüplerine (2 mL) yerleştirildi ve 600 µL Tampon RA3 eklendi. 11,000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.

- Akıntı atılarak sütunlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi. NucleoSpin® RNA Kolonuna 250 µL Tampon RA3 eklendi.
- Membranın tamamen kuruması için 11000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.
- Kolonlar tekrar nükleaz içermeyen bir toplama tüplerine yerleştirildi.
- Kolonlara 60 µL RNaz içermeyen H₂O eklendi ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüjlendi.
- Filtre atılıp, izole edilen RNA'ların nanodropta (Thermo Scientific, ABD) ile saflığı, kalitesi ve miktarları belirlenerek, -80°C'de saklandı.

3.5.2. Elde edilen RNA'lardan cDNA oluşturulması

Beyin dokusundan izole edilen RNA'lar kit protokolüne (ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit, New England Biolabs Inc. Ipswich, MA, ABD, Kat no: E6300S) uygun olarak reverse transkripsiyon işlemi ile cDNA'ya çevrildi. Tüm işlemler buz üzerinde ve laminar kabin içerisinde yapıldı.

Çalışma yöntemi:

- Kit protokolüne göre elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları 10 ng/µL olacak şekilde RNaz içermeyen H₂O ile dilüe edilerek standart hale getirildi.
- 6 µL total RNA örneği ve 2 µL oligo-dT primer [d (T) 23VN] steril RNaz/DNaz içermeyen düz kapaklı 0.2 ml'lik PCR tüplerine konularak 70°C'de 5 dakika inkübe edildi (T100™ Thermal cycle, Bio-Rad, CA, ABD).
- Örnekler üzerine 10 µL M-MuLV reaksiyon karışımı ve 2 µL M-MuLV enzim karışımı eklendi.
- Toplam hacmi 20 µL olan örnekler cDNA elde edilmesi için 42°C'de bir saat ve enzimlerin inaktivasyonu için 80°C'de beş dakika inkübe edildi.
- Elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

3.5.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile gen ifadesi tayini

Gen ifadelerinin belirlenmesinde her bir örnek için üçer tekrar olmak üzere **Tablo 3.1**'de belirtilen reaksiyon bileşenleri optik kapaklı PCR tüplerine konuldu. Kullanılan primerlerin listesi **Tablo 3.2**'de verildiği gibidir. Hazırlanan örnekler Stratagene Mx3000p Real-Time PCR cihazına (California, USA) konularak **Tablo 3.3**'de verilen PCR koşullarında amplifikasyonları gerçekleştirildi. Her bir amplifikasyon aşamasında cDNA kalıbı içermeyen kontrol grubu (no template control, NTC) kullanıldı.

Tablo 3.1 Real-time PCR için reaksiyon başına gerekli kit bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)
cDNA	10
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	25
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Nükleaz Free Su	13
Toplam Hacim	50

Tablo 3.2 Real Time PCR'da Kullanılan Primerler

Gen	Forward primer	Reverse primer
RIPK1	5'-AGGAGGAAAGGAAGCGAAGG-3'	5'-GGTTGTGCTGGGATAAGGAAGA-3'
RIPK3	5'-CAAACCAAACCACTGAGCGAG-3'	5'-CGTCTACAACGTCTACGGCT-3'
MLKL	5'-TTGGTTTTGAGGGCTCGGCT-3'	5'-TCTCCTGAGCCCCTTCCCTT-3'
CASP3	5'-GGAGCTTGGAACGCGAAGAA-3'	5'-ACACAAGCCATTCAGGGT-3'
CASP8	5'-ATGGCTACGGTGAAGAACTGCG-3'	5'-TAGTTCACGCCAGTCAGGATGC-3'
GAPDH	5'-GTTTGTGATGGGTGTGAACC-3'	5'-TCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'

Tablo 3.3 Real-time PCR koşulları

Segment	Segment fonksiyonu	Sıcaklık	Zaman (dakika:saniye)	Döngü sayısı
Segment 1	Enzim aktivasyonu	55°C	01:00	1
Segment 2	Denatürasyon	95°C	00:30	40
	Bağlanma	55°C	01:00	
	Uzama	72°C	01:00	
Segment 3	Erime Eğrisi	95°C	01:00	1
		55°C	00:30	
		72°C	00:30	

Hedef gen ifadeleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) referans gen (housekeeping gen) ile normalize edildi. Real-Time PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak değişim katsayısı $2^{-\Delta CT} = 2^{-(Ct \text{ gen} - Ct \text{ referans gen})}$ formülü kullanılarak hesaplandı (Schmittgen & Livak, 2008). cDNA kalıbı yokluğunda amplifikasyon olmadığı gözlemlendi.

3.6. Beyin Dokularında Protein Düzeylerinin Ölçümü

Deney hayvanlarından elde edilen beyin doku örneklerinde *Kaspaz 3*, *Kaspaz 8*, *RIPK1*, *RIPK3*, *MLKL*, *PARP* ve *TNF- α* protein düzeyleri ELISA yöntemi ile ilişkili kitler (Shanghai YL Biotech Co., Ltd, Çin, **Tablo 3.4**) kullanarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Tablo 3. 4 Kullanılan ELISA Kitlerinin Katalog Numaraları

Protein Adı	Katalog No
<i>Kaspaz 3</i>	YLA0017RA
<i>Kaspaz 8</i>	YLA1531RA
<i>RIPK1</i>	YLA1497RA
<i>RIPK3</i>	YLA1498RA
<i>MLKL</i>	YLA1503RA
<i>PARP</i>	YLA0864RA
<i>TNF-α</i>	YLA0118RA

3.6.1. Beyin dokusu örneklerinin hazırlanması

-80°C'de saklanan doku örnekleri ELISA çalışmaları için tartılarak üzerlerine PBS (pH 7.4) konuldu. Ultrasonik homejenitör ile homojenize edildikten sonra 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatantlar viallere ayrılarak -80°C' de muhafaza edildi.

3.6.2. Standartların hazırlanması

Stok solüsyonlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Çalışma için kullanılacak olan standart solüsyonlar ilgili stok solüsyonlar kullanılarak **Tablo 3.5**'te verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3. 5 Protein Seviyesi Ölçümünde Kullanılan Standart Solüsyonların Hazırlanması.

Standartlar	Hazırlanma Yöntemi
5. Standart	120 µL Orijinal Standart + 120 µL Standart dilüent
4. standart	120 µL 5. Standart + 120 µL Standart dilüent
3. standart	120 µL 4. Standart + 120 µL Standart dilüent
2. standart	120 µL 3. Standart + 120 µL Standart dilüent
1. standart	120 µL 2. Standart + 120 µL Standart dilüent

Kullanılan orijinal stok solüsyon konsantrasyonları ve yapılan seri dilüsyonlar sonucu oluşturulan standartların konsantrasyonları ve **Tablo3.6**'de verilmiştir.

Tablo 3.6 Protein düzeyi ölçümünde kullanılan stok ve standart solüsyonların konsantrasyonları.

Solüsyonlar	<i>Kaspaz 3</i> (ng/mL)	<i>Kaspaz 8</i> (pmol/L)	<i>Ripk1</i> (ng/L)	<i>Ripk3</i> (ng/L)	<i>MLKL</i> (pg/mL)	<i>PARP</i> (µmol/L)	<i>TNF-α</i> (ng/L)
1. Standart	0.4	3.75	12.5	5	1.5	50	40
2. Standart	0.8	7.5	25	10	3	100	80
3. Standart	1.6	15	50	20	6	200	160
4. Standart	3.2	30	100	40	12	400	320
5. standart	6.4	60	200	80	24	800	640
Stok	12.8	120	400	160	48	1600	1280

3.6.3. Protein düzeylerinin ölçümü

Çalışma yöntemi:

- ELISA plakasının ilk kuyucuğu kör olarak kullanıldı.
- İlk kuyucuktan sonraki kuyucuklara sırasıyla, standart 1, standart 2, standart 3, standart 4, standart 5 olacak şekilde, 50'şer µL seri dilüsyonla hazırlanan standart solüsyonlardan pipetlendi. Üzerlerine 50'şer µL Streptavidin HRP eklendi.
- Kalan kuyucuklara örneklerden 40 µL eklenildi. Üzerine 10 µL MT antibodies biotin ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi.
- Plakanın üzeri yapışkan film ile kaplandı. Plaka tabanı hafifçe vurularak kimyasalların karışması sağlandı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Plakalardaki sıvı boşaltıldı ve 5 kez yıkama aşaması uygulandı. ELISA plakaların yıkanma basamakları ELISA Plate Yıkayıcı (Biotek ELx50Biyotek, BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) ile gerçekleştirildi. Yıkayıcı her kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu ekleyecek ve kuyucularda enjeksiyon ve aspirasyon aralığı 60 saniye olacak şekilde ayarlandı.

- K r de dahil olmak üzere her kuyucuğa 50'Şer  L Chromogen A ve 50  L Chromogen B eklendi.
- Plakanın  zeri yapışkan film ile kaplandı Plaka tabanı hafifçe vurularak kimyasalların karışması sağlandı ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu sürede plakanın ıŐıĐa maruz kalmaması sağlandı.
- Her kuyucuğa 50  L Stop solüsyonu eklenildi.
- Son aŐamadan sonra hızlı bir Şekilde plaka üzerindeki kuyucukların OD değeri 450 nm'de MultiskanGO UV/VIS (Thermo Scientific, MA, ABD) cihazı kullanılarak okundu.
- Standart eğri hazırlanarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7. Beyin  rneklerinden Histolojik Preparatların Hazırlanması

Çalışma yöntemi:

- Deney sonunda dokular %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine konularak hafta bekletildi.
- Formaldehitten  kartılan örnekler fiksatifin  ekelmesinin engellenmesi amacı ile 3-4 saat  eŐme suyunda yıkandı. Takiben dehidrasyonlarının sağlanması için kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletildi.
- Dehidrasyon işlemi tamamlanan örnekler, 2 kez 20'Şer dakika ksilolde bekletilerek ŐeffaŐtırıldı ve etüv içerisinde 65°C'de eritilmiŐ parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi.
- Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı. Mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı.

- Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletildi.
- Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi.
- Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi.
- Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eozin ile 10 dakika boyandı.
- Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonları sağlandı.
- Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı. Hazırlanan dokular entellan ile kapatılarak ışık mikroskobik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve beyin örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.
- Kesitler nekrotik hücre, apoptotik hücre, vasküler kongesyon, vasküler dilasyon açısından incelendi. Örnekler 0: hasar yok, 1: az hasar, 2: orta hasar, 3: ağır hasar olarak skorlandı.

3.8. İmmünohistokimyasal Boyama

Deney hayvanlarından alınan beyin dokularından hazırlanan parafin bloklardan ile 5µm'lik kesitler alınarak poli-L-lisinli lamalar üzerine konuldu. Bu örneklerde nekrotoz ve apoptozun belirlenmesi için kaspaz 3 (Tavşan poliklonal, Dilüe 1:100; Kat no: 19677-1-AP, Proteintech, ABD), kaspaz 8 (Tavşan poliklonal, Dilüe 1:100; Kat no: 13423-1-AP, Proteintech, ABD), RIP3 (Tavşan poliklonal, Dilüe 1:100; Kat no: 17563-1-AP, Proteintech, ABD), MLKL (Tavşan poliklonal, Dilüe 1:100; Kat no: 21066-1-AP, Proteintech, ABD) antikorları ve UltraVision LP

Detection System (Kat no:TA-125-HA, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak immünohistokimyasal işaretlemleri yapıldı.

Çalışma yöntemi:

- Örnekler 10 dakika süreyle 2 defa ksilende bekletildi.
- Deparafinize olan örnekler %5'er dakika sırası ile %100, %95, %80 ve %60 etanol ile inkübe edildi.
- Her bir örnek 3'er dakika 3 kez PBS ile yıkandı.
- Örnekler bir kaba aktarılarak üzerleri Sitrat tamponu (pH6, 0.01 M) ile kapatıldı.
- Örnekleri içeren kap içerisinde distile su bulunan basınçlı bir kaba aktarılarak, kapağı kapatıldı.
- Örnekler 10 dakika kaynatıldı ve örnekler oda sıcaklığında yaklaşık 35 dakika bekletilerek soğuması sağlandı.
- Örneklerin Her biri 3 dakika boyunca PBS ile üç kez yıkandı.
- Reaktiflerin doku dışına taşmasını önlemek için, örneklerin etrafındaki doku bölümleri "DAKO Pen" kullanılarak çizildi.
- Endojen peroksidaz etkinliğinin engellenmesi için örnekler 10 dakika boyunca hydrogen peroxide block ile inkübe edildi.
- Örnekler 3 dakika boyunca ile üç kez PBS ile yıkandı.
- Örneklerle bloke edici serum (Ultra V Block) uygulanarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Örneklerle 1:100 oranında dilüe edilen antikor eklenerek 4°C de gece boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol için antikor eklenmedi.
- Örnekler 3 dakika boyunca PBS ile 3 kez durulandı.
- Örneklerle primary antibody enhancer eklenerek 10 dakika inkübe edildi.

- Her bir örneğe 50 µL Sekonder antikor olan Anti-Rabbit Ig uygulanarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Örneklere HRP Polimeri uygulanarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Örnekler üçer kez 3 dakika boyunca PBS ile yıkandı.
- Her bir örnek için 40 µL DAP plus Chromogen ve 2 ml DAP plus substrat karışımı hazırlanarak dolulara uygulanarak beş dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
- Örnekler dört kez distile su ile yıkandı.
- Örneklere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.
- Boyanan örnekler distile su ile yıkandı.
- Örnekler 5 dakika boyunca %60, %80, %90 ve %100 etanol serilerinde dehidre edildi.
- Örnekler 5 dakika boyunca iki kez ksilende bekletilerek şeffaflaştırıldı.
- Kesitler “Histomount” ile kapatıldı.
- Örneklerin Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve beyin örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.
- Skorumlama -: yok, +: hafif dağılım, ++: orta dağılım ve +++: yoğun dağılım olarak yapıldı.

3.9. TUNEL Yöntemiyle Apoptozun Belirlenmesi

Beyin dokularında iskemi, reperfüzyon süreci ve bu süreçte apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk, panneksin kanalı inhibitörü probenecid ve bu iki inhibitörün birlikte kullanımının apoptotik hücre ölümüne etkisinin

belirlenmesinde, apoptotik hücrelerde fragmente olan DNA'ların 3'-OH DNA uçlarına, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanarak fluorescein-12-dUTP'nin katalitik olarak eklenmesiyle oluşan polimerik kuyruğun floresan mikroskopla görüntülenmesi prensibi ile çalışan DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega Cor., Wyoming, ABD, Katalog no:G3250) kiti kullanıldı.

Çalışma yöntemi:

- Mikroskop lamalarına hazırlanmış olan parafinlenmiş doku preparatları oda sıcaklığında 5 dakika boyunca şaleler içerisinde bulunan taze ksilende bekletilerek deparafinize edildi. Bu aşama iki defa tekrarlandı.
- Deparafinize edilen örnekler oda sıcaklığında %100'lük etanol içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- Örnekler oda sıcaklığında sırasıyla %100, %95, %85, %70 ve %50'lik etanolde 3'er dakika tutularak örneklerin rehidrasyonu sağlandı.
- Örnekler oda sıcaklığında %0.85'lik NaCl içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- Oda sıcaklığında bulunan örnekler PBS içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika PBS ile hazırlanan %4'lük metanol içermeyen formaldehit çözeltisi içerisinde bekletilerek doku bölümlerinin sabitlenmesi sağlandı.
- Sabitlenen örnekler oda sıcaklığında PBS içerisinde 5 dakika boyunca bekletilerek yıkandı. Yıkama işlemi iki defa yapıldı.
- Örneklerden sıvı uzaklaştırılması yapıldı ve her biri düz bir yüzeye yerleştirildi.

- PBS kullanılarak 1:500 dilüsyon ile 20 µg/mL Proteinaz K çözeltisi hazırlanarak her bir doku kesitinin üzerine 100 µL Proteinaz K eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında örnekler oda sıcaklığında PBS içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika PBS ile hazırlanan %4'lük metanol içermeyen formaldehit çözeltisi içerisinde bekletilerek doku bölümlerinin sabitlenmesi sağlandı.
- Örnekler PBS içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- Örneklerdeki fazla sıvı uzaklaştırılarak üzerlerine 100 µL dengeleme tamponu eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Standart 50 µL'lik reaksiyon başına 45 µL dengeleme tamponu, 5 µL nükleotid karışımı ve 1 µL rTdT enzimi kullanılarak inkübasyon tamponu hazırlandı. İnkübasyon tamponunun hazırlanması ve bundan sonraki basamaklar karanlık ortamda gerçekleştirildi.
- Dengeleme alanlarının etrafında kalan dengeleme tamponu uzaklaştırılarak 5 cm² alandaki hücelere 50 µL rTdT inkübasyon tamponu eklendi. Hücrelerin kurumamasına dikkat edildi.
- Reaktifin eşit şekilde dağılmasını sağlamak için hücreleri plastik lameller ile kaplandı. Sıcaklığı 37°C olarak ayarlanmış ve nemlendirilmiş etüvde 60 dakika inkübe edildi.
- Kit içeriğinde bulunan 20XSSC deiyonize su ile 1:10 oranında dilüe edilerek 2X'lik SSC elde edildi. Örneklerin plastik lamelleri çıkartılarak 2X SSC bulunan şalelere yerleştirilerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

- Hücrelerdeki bağlanmamış floresan-12-dUTP'lerin uzaklaştırılması için örnekler PBS içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
- Hücre çekirdeklerini boyamak için her bir örneğe DAPI damlatılarak üzerlerine lamel yerleştirildi. Kenarları kapatılarak kuruması için 10 dakika beklendi.
- Hazırlanan örnekler Axio observer Z1(Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Almanya) floresan mikroskobu ile 520nm ve 460nm dalga boylarında gözlenerek, 63X objektif kullanılarak fotoğraflandı.
- Fotoğraflar ImageJ analyzer programı ile analiz edildi.
- Apoptoz yüzdesi = (Tunel ile işaretlenmiş çekirdek sayısı / toplam çekirdek sayısı) * 100 olarak hesaplandı.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli değişkenlerin norma dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Kruskal-Wallis parametrik olmayan varyans analizi ile gerçekleştirildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi kullanıldı. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama \pm standart sapma, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri medyan, 25. ve 75. persantil ile gösterildi. Kategorik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında oran testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesi uygulanarak yapıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edildi. Tüm analizler SAS University Edition Release 3.8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.) programı kullanılarak yapıldı.

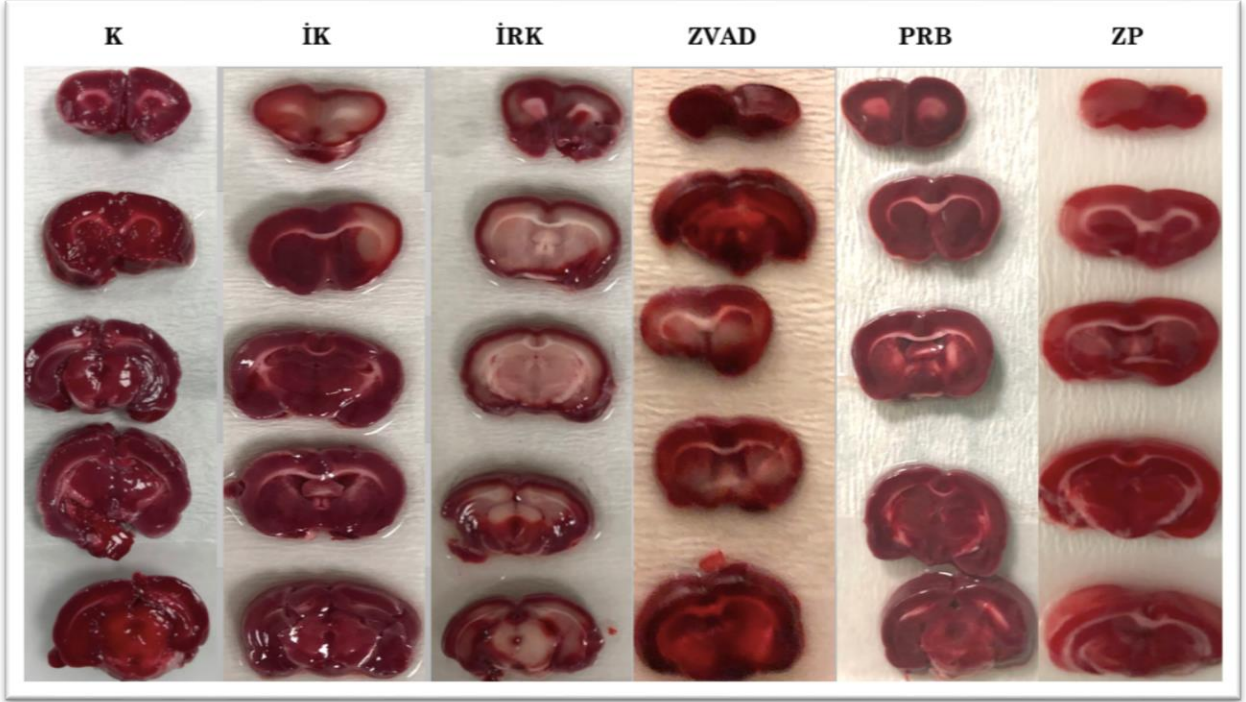
4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında sağ arteria carotis communis'e klemp takılması ile deneysel olarak oluşturulan beyin iskemi/reperfüzyon hasarında panneksin-1 proteininin apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisi araştırıldı.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nde her grupta on iki sıçan olmak üzere altı deney grubu oluşturularak deneysel aşamaları tamamlandı. Çalışma sonucunda beyin dokuları uygun olarak alındı. Çalışma sonunda elde edilen doku örnekleri gruplarda beyin enfarkt hacminin makroskobik olarak belirlenmesinde kullanıldı. Ayrıca gruplardan elde edilen beyin dokusu örneklerinde Real -Time PCR ile kaspaz 3, kaspaz 8, RIP1, RIP3 ve MLKL gen ifadelerindeki değişim ile *kaspaz 3*, *kaspaz 8*, *RIP1*, *RIP3*, *MLKL*, *PARP* ve *TNF- α* protein düzeylerindeki değişim incelendi. Yine bu çalışma dahilinde doku örnekleri H&E boyama yöntemi ile incelenerek, patolojik değişiklikler değerlendirildi. Parafinize edilen dokular kullanılarak TUNEL yöntemiyle apoptoz belirlenmesi çalışması yapıldı. Bu parafinize edilen dokularda, nekroptoz ve apoptozun belirlenmesi için, kaspaz 3, kaspaz 8, RIP3 ve MLKL antikoları kullanılarak immünohistokimya (IHC) çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1. Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi

Deneysel çalışmalar sonucunda TTC ile boyanan kesitler ile ilgili örnek görseller **Şekil 4.1**'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçları **Tablo 4.1** ve **Şekil 4.2**'de, grupların ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.2**'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 Beyin örneklerinde TTC Boyama Sonrasında Enfarkt Alanların Makroskopik Görüntüsü.

Kontrol grubuna göre tüm grupların enfarkt hacim yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi ($p < 0.0001$). Enfarkt hacim yüzdesi İRK grubunda İK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p < 0.0001$). Ayrıca İRK grubu ile karşılaştırma yapıldığında ZVAD, PRB ve ZP gruplarının enfarkt hacim yüzdelerinin istatistiksel olarak önemli bir şekilde azaldığı belirlendi ($p < 0.0001$). ZVAD grubuna göre PRB ve ZP gruplarında enfarkt hacim yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı ($p = 0.0115$ ve $p < 0.0001$). PRB ve ZP grupları arasında da enfarkt hacim yüzdesi bakımından istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlendi ($p = 0.0030$, **Tablo 4.2**).

Yapılan bu çalışma sonucunda iskemi sürecinde beyin enfarkt hacminin arttığı, iskemiye takip eden reperfüzyonun bu hasarın daha da artmasına sebep olduğu gözlemlendi. Ayrıca apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın ve *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımı enfarkt hacminin azalmasına neden

olmuşsa da Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılmasının enfarkt hacmini önemli ölçüde azaltarak reperfüzyon hasarına karşı tedavi edici bir etki sağladığı belirlendi.

Tablo 4.1 Deney gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulguları

K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
0.00 ± 0.00	18.83 ± 1.16	51.35 ± 4.10	35.16 ± 0.44	27.32 ± 2.72	17.97 ± 2.27	
0.00	18.56	51.07	35.16	28.41	18.89	<0.0001*
(0.00-0.00)	(17.82-20.10)	(47.40-55.59)	(34.71-35.60)	(24.23-29.32)	(15.38-19.62)	

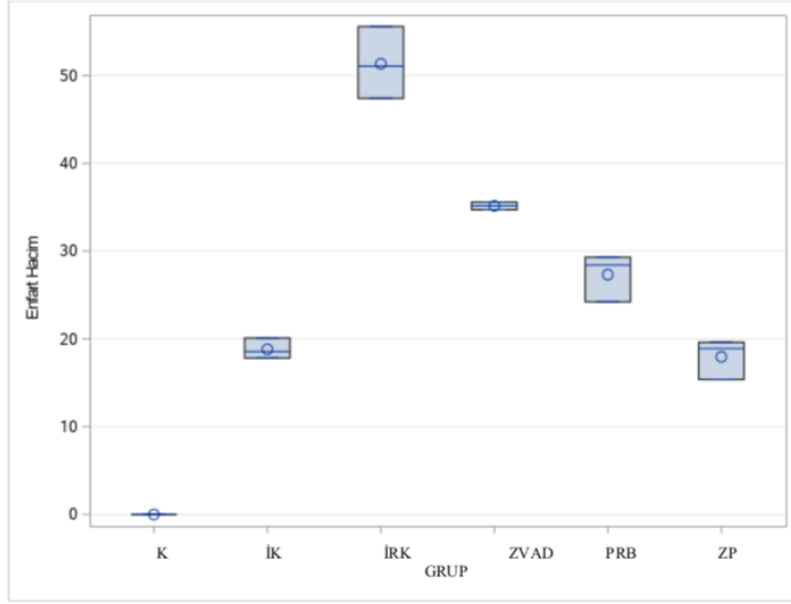
Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

Q1: 25. Persantil, Q2: Medyan, Q3: 75. Persantil

*: Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.2 Deney Gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzde Bulgularının Tukey Çoklu Karşılaştırma Testine Göre İkili Çoklu Karşılaştırılmaları

Grup	p-Değeri	Grup	p-Değeri	Grup	p-Değeri
K vs. İK	<0.0001	İK vs. İRK	<0.0001	İRK vs. ZVAD	<0.0001
K vs. İRK	<0.0001	İK vs. ZVAD	<0.0001	İRK vs. PRB	<0.0001
K vs. ZVAD	<0.0001	İK vs. PRB	0.0063	İRK vs. ZP	<0.0001
K vs. PRB	<0.0001	İK vs. ZP	0.9966	ZVAD vs. PRB	0.0115
K vs. ZP	<0.0001	PRB vs. ZP	0.0030	ZVAD vs. ZP	<0.0001



Şekil 4.2 Deney gruplarında Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulguları.

4.2. Genlerin İfade Seviyeleri

4.2.1. Kaspaz 3 gen ifadesi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda deney gruplarından elde edilen kaspaz 3 gen ifadesi ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.3** ve **Şekil 4.3**'de, kaspaz 3 gen ifadesinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.4**'de verilmiştir.

Grupların kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda ZVAD ($p=1$) ve ZP ($p=0.5440$) gruplarının kaspaz 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, İK ($p=0.0101$), İRK ($p=0.0101$) ve PRB ($p=0.0100$) gruplarının kaspaz 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak artış belirlendi. Ayrıca İK grubuna göre İRK grubunda ($p=0.0101$) kaspaz 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli artış bulundu. İRK grubu ile tedavi grupları olan ZVAD, PRB ve ZP gruplarının karşılaştırılmasında bu gruplarda kaspaz 3 gen ifadesinin istatistiksel düzeyde önemli bir şekilde azaldığı belirlendi ($p=0.0101$, $p=0.0100$, $p=0.0100$; sırasıyla). ZVAD grubu kaspaz 3 gen ifadesi PRB grubuna göre azalırken ($p=0.0100$), ZP

grubunun gen ifadesi ZVAD ve PRB grupları ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.4071, p=0.1170; sırasıyla, **Tablo 4.4**).

Bu sonuçlara göre iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin kaspaz 3 gen ifadesini arttırdığı belirlendi. Apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanımının *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımına göre iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan kaspaz 3 ifadesini daha fazla azalttığı gözlemlendi. İki inhibitörün birlikte kullanımının iskemi-reperfüzyon sürecinde artan kaspaz 3 gen ifadesini azalttığı ve bu sonucun Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanılması ile aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

Tablo 4.3 Deney gruplarında kaspaz 3 gen ifadesinin karşılaştırılması.

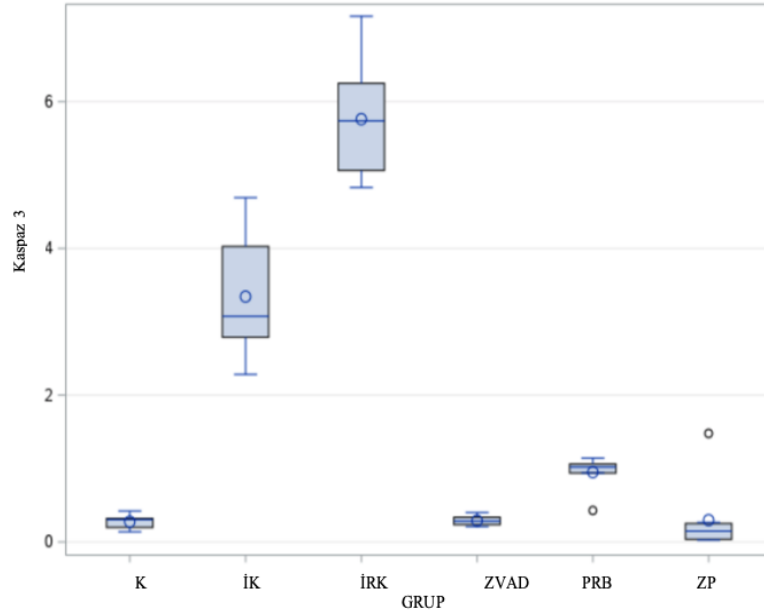
KASPAZ 3						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
0.27 ± 0.09	3.34 ± 0.82	5.76 ± 0.80	0.29 ± 0.06	0.95 ± 0.22	0.29 ± 0.48	
0.30	3.07	5.73	0.28	1.02	0.14	<0.001*
(0.19-0.32)	(2.78-4.02)	(5.06-6.25)	(0.23-0.33)	(0.93-1.06)	(0.03-0.25)	

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma
Q1: 25. Persantil, Q2: Medyan, Q3: 75. Persantil
**: Kurskal-Wallis Test*

Tablo 4.4 Kaspaz 3 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları

GRUP	Wilcoxon Z	DSCF Değeri	p-Değeri
K vs. İK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZVAD	-0.0525	0.0743	1.0000
K vs. PRB	-3.3631	4.7562	0.0100
K vs. ZP	1.6816	2.3781	0.5440
İK vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. ZVAD	3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. PRB	3.3631	4.7562	0.0100
İK vs. ZP	3.3631	4.7562	0.0100
İRK vs. ZVAD	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. PRB	3.3631	4.7562	0.0100
İRK vs. ZP	3.3631	4.7562	0.0100
ZVAD vs. PRB	-3.3631	4.7562	0.0100
ZVAD vs. ZP	1.8918	2.6754	0.4071
PRB vs. ZP	2.5242	3.5698	0.1170

DSCF: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi



Şekil 4.3 Kaspaz 3 gen ifadeleri.

4.2.2. Kaspaz 8 gen ifadesi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen kaspaz 8 gen ifadeleri ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.5** ve **Şekil 4.4**'de, kaspaz 8 gen ifadesinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.6**'da verilmiştir.

Grupların K grubu ile karşılaştırılması sonucunda İK, İRK ve PRB gruplarında kaspaz 8 gen ifadesinin istatistiksel olarak anlamı bir düzeyde arttığı ($p=0.0101$; her birinde); ZVAD ve ZP gruplarının kaspaz 8 ifadesinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0.4080$, $p=0.9952$; sırasıyla). İK ve İRK gruplarının karşılaştırılmasında, İRK grubunun kaspaz 8 gen ifadesinin istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi ($p=0.0101$). İRK grubunun kaspaz 8 ifadesinin ZVAD, PRB ve ZP gruplarından elde edilen sonuçların karşılaştırılması sonucunda üç grupta da ilgili gen ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p=0.0101$, her birinde). ZVAD grubunun kaspaz 8 gen ifadesinin PRB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p=0.0101$) belirlenirken, ZP ve ZVAD gruplarının kaspaz 3 gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.9888$). ZP grubu kaspaz 8 gen ifadesinin PRB grubuna göre azaldığı belirlendi ($p=0.0101$).

Çalışmamızda beyin İ/R sürecinin kaspaz 8 ifadesini arttırdığı belirlendi. İki saatlik iskemi sürecinin oluşturduğu hasar ile bu iki saatlik iskemi sonrasında sağlanan 24 saatlik kan akımının karşılaştırılmasında, reperfüzyon sürecinin kaspaz 8 gen ifadelerini arttırarak doku hasarını genişlettiği belirlendi. Çalışmamız sonucunda Z-VAD-fmk uygulaması ile her iki inhibitörün birlikte uygulanmasının İ/R nedeni ile artan kaspaz 8 gen ifadesini azaltmada aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

Tablo 4.5 Deney gruplarında kaspaz 8 gen ifadelerinin karşılaştırılması.

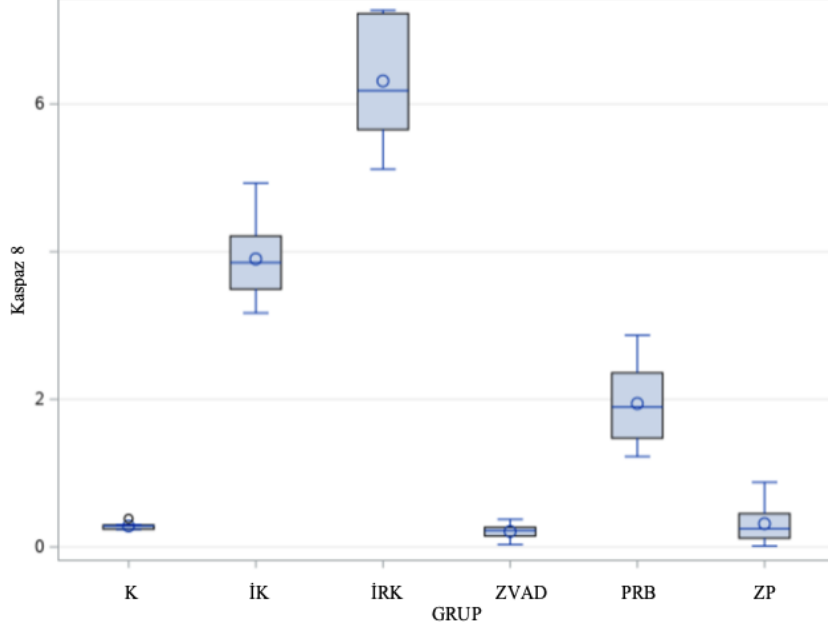
KASPAZ 8						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
0.28 ± 0.05	3.90 ± 0.56	6.31 ± 0.88	0.21 ± 0.11	1.94 ± 0.58	0.32 ± 0.28	
0.29	3.85	6.18	0.22	1.89	0.25	<0.001*
(0.24-0.30)	(3.49-4.21)	(5.65-7.23)	(0.15-0.27)	(1.47-2.36)	(0.12-0.45)	

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma
Q1: 25. Persantil, Q2: Medyan, Q3: 75. Persantil
**: Kurskal-Wallis Test*

Tablo 4.6 Kaspaz 8 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları

GRUP	Wilcoxon Z	DSCF Değeri	p-Değeri
K vs. İK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZVAD	1.8904	2.6734	0.4080
K vs. PRB	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZP	0.5251	0.7426	0.9952
İK vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. ZVAD	3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. PRB	3.0456	4.3071	0.0281
İK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZVAD	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. PRB	-3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. ZP	-0.6301	0.8911	0.9888
PRB vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101

DSCF: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi



Şekil 4.4 Kaspaz 8 gen ifadeleri.

4.2.3. RIP1 gen ifadesi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen RIP1 gen ifadesi ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) Tablo 4.7 ve **Şekil 4.5**'de, RIP1 gen ifadelerinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.8**'de verilmiştir.

K grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda İK ($p=0.0101$), İRK ($p=0.0101$), ZVAD ($p=0.0101$) ve PRB ($p=0.0144$) gruplarında RIP1 gen ifadelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi. K ve ZP gruplarının RIP1 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.8329$). İRK grubunda ilgili gen ifadesinin İK ($p=0.0144$), PRB ($p=0.0101$) ve ZP ($p=0.0101$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, ZVAD grubuna göre ise azaldığı ($p=0.0101$) belirlendi. PRB ve ZP grubunun RIP1 gen ifadesinin ZVAD grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı ($p=0.0101$; her ikisinde de) belirlenirken PRB ve ZP gruplarının RIP1 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0.1897$).

Elde edilen sonuçlara göre iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin iskemi sürecine göre dokuda bulunan RIP1 gen ifadelerini arttırdığı belirlendi. Apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanımı RIP1 gen ifadesinin yükselmesine neden olurken *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımı RIP1 gen ifadesinin azalmasına neden olduğu gözlemlendi. Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılması ise İ/R sürecinde artan RIP1 gen ifadesini önemli ölçüde azalttığı belirlendi.

Tablo 4.7 Deney gruplarında RIP1 gen ifadelerinin karşılaştırılması.

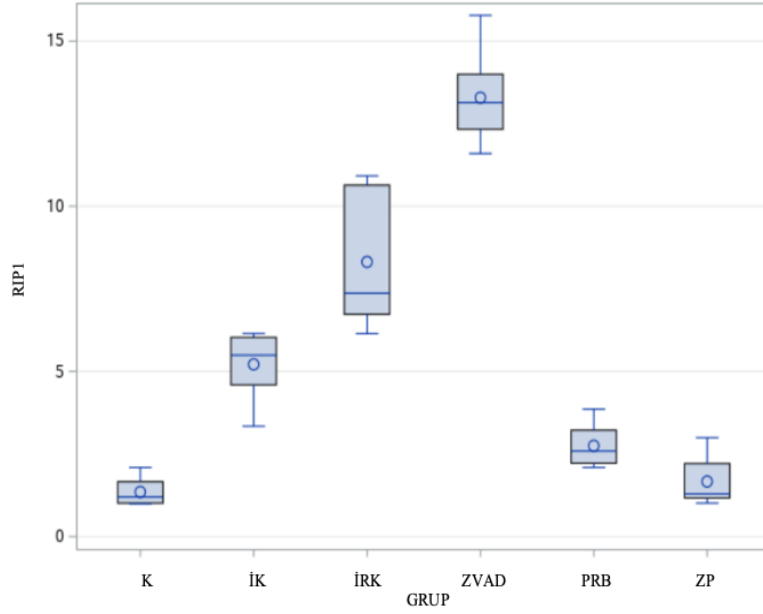
RIP1						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
1.35 ± 0.46	5.22 ± 0.98	8.32 ± 2.05	13.29 ± 1.34	2.75 ± 0.65	1.67 ± 0.74	
1.20	5.49	7.37	13.14	2.59	1.29	<0.001*
(1.02-1.66)	(4.60-6.03)	(6.73-10.64)	(12.34-13.99)	(2.22-3.22)	(1.17-2.21)	

Ort.: Ortalama, *S.S.:* Standart Sapma
Q1: 25. Persantil, *Q2:* Medyan, *Q3:* 75. Persantil
 *: Kurskal-Wallis Test

Tablo 4.8 RIP 1 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	Wilcoxon Z	DSCF Değeri	p-Değeri
K vs. İK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. PRB	-3.2557	4.6042	0.0144
K vs. ZP	-1.2086	1.7093	0.8329
İK vs. İRK	-3.2557	4.6042	0.0144
İK vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. PRB	3.1506	4.4557	0.0202
İK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
PRB vs. ZP	2.3105	3.2675	0.1897

DSCF: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi



Şekil 4.5 RIP1 gen ifadeleri.

4.2.4. RIP3 gen ifadesi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen RIP3 gen ifadeleri ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.9** ve **Şekil 4.6'**da RIP3 gen ifadelerinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.10'**da verilmiştir.

K grubu RIP3 gen ifadesinin tüm grupların ilgili gen ifadeleri ile ikili karşılaştırılmaları sonucunda PRB ve ZP grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0.0911$, 0.9008 ; sırası ile) İK, İRK ve ZVAD gruplarında istatistiksel olarak önemli artış bulundu ($p=0.0101$; her biri için). Ayrıca İRK grubunun RIP3 gen ifadesinin İK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı tespit edildi ($p=0.0202$). İRK grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalarda PRB ve ZP grubunun RIP3 gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0.0101$, her ikisi için). ZVAD grubu RIP3 gen ifadesinin İRK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p=0.0202$). ZVAD grubuna göre PRB ve ZP grubu RIP3 gen ifadelerinde istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlendi ($p=0.0101$, her biri için). PRB grubuna göre ZP grubu RIP3 gen ifadelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p=0.0101$) azaldığı belirlendi (**Tablo 4.10**).

İskemi süreci ile karşılaştırıldığında İ/R sürecinde RIP3 gen ifadelerinin arttığı belirlendi. Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanılarak apoptozun inhibisyonunun bu artışın devam etmesine sebep olduğu belirlendi. Oluşturulan İ/R hasarında artan RIP3 gen ifadesinin azalmasında probenecidin tek başına kullanılması etkili olmuş olsa da Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanımı RIP3 gen ifadesini önemli ölçüde azaltmıştır.

Tablo 4.9 Tablo 4.9 Deney gruplarında RIP3 gen ifadelerinin karşılaştırılması.

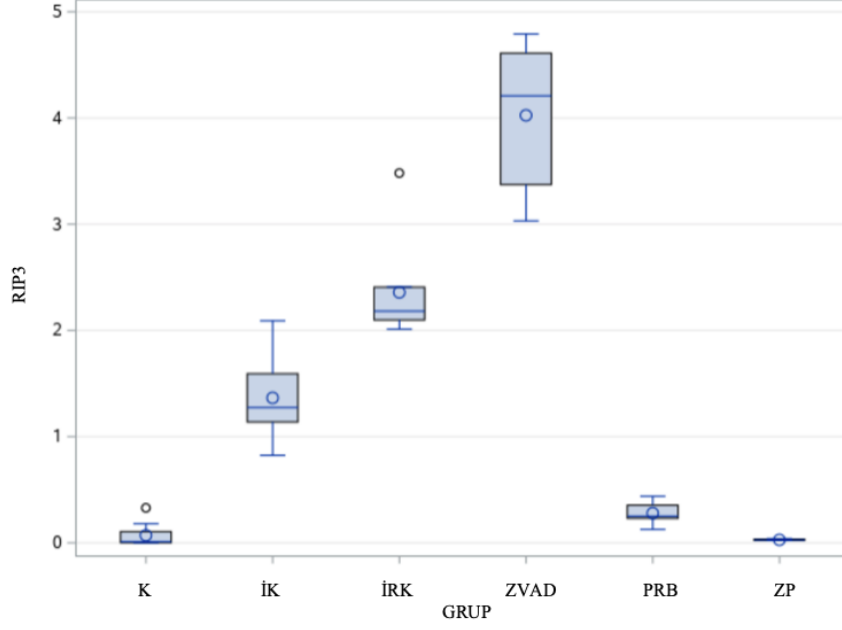
RIP3						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
0.07 ± 0.12	1.37 ± 0.42	2.36 ± 0.48	4.03 ± 0.70	0.28 ± 0.10	0.03 ± 0.01	
0.01	1.27	2.18	4.21	0.25	0.03	<0.001*
(0.002-0.11)	(1.14-1.59)	(2.10-2.41)	(3.37-4.61)	(0.23-0.36)	(0.02-0.04)	

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma
Q1: 25. Persantil, Q2: Medyan, Q3: 75. Persantil
**: Kurskal-Wallis Test*

Tablo 4.10 RIP 3 gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	Wilcoxon Z	DSCF Değeri	p-Değeri
K vs. İK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. PRB	-2.6255	3.7131	0.0911
K vs. ZP	-1.0502	1.4852	0.9008
İK vs. İRK	-3.1506	4.4557	0.0202
İK vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZVAD	-3.1506	4.4557	0.0202
İRK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
PRB vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101

DSCF: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi



Şekil 4.6 RIP3 gen ifadeleri.

4.2.5. MLKL gen ifadesi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen MLKL gen ifadeleri ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.11** ve **Şekil 4.7**'de; MLKL gen ifadelerinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.12**'de verilmiştir.

K grubu ile tüm grupların MLKL gen ifadelerinin ikili karşılaştırmaları sonucunda, ZP grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark belirlenmezken ($p=0.0598$); İK ($p=0.0101$), İRK ($p=0.0101$), ZVAD ($p=0.0101$) ve PRB ($p=0.0385$) gruplarının MLKL gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi. İRK grubunun ilgili gen ifadesinde İK grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış belirlendi ($p=0.0101$). PRB ve ZP gruplarının MLKL gen ifadelerinin İRK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p=0.0101$). İRK ile ZVAD gruplarında MLKL gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.1897$). PRB ve ZP gruplarının ilişkili gen ifadeleri ZVAD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p=0.0101$) azaldı. ZP ve

PRB gruplarının MLKL gen ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0.4080$) belirlenmedi (**Tablo 4.12**).

İskemi ve bu süreci takip eden reperfüzyon aşaması ile artan MLKL gen ifadesi panneksin inhibitörü olan probenecid kullanımı ile azalmıştır. Probenecidin tek başına kullanımının Z-VAD-fmk ile birlikte kullanımı ile karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen iki inhibitörün birlikte kullanılmasının MLKL gen ifadesinin İ/R hasarında artan gen ifadesini daha fazla azalttığı belirlendi.

Tablo 4.11 Deney gruplarında MLKL gen ifadelerinin karşılaştırılması.

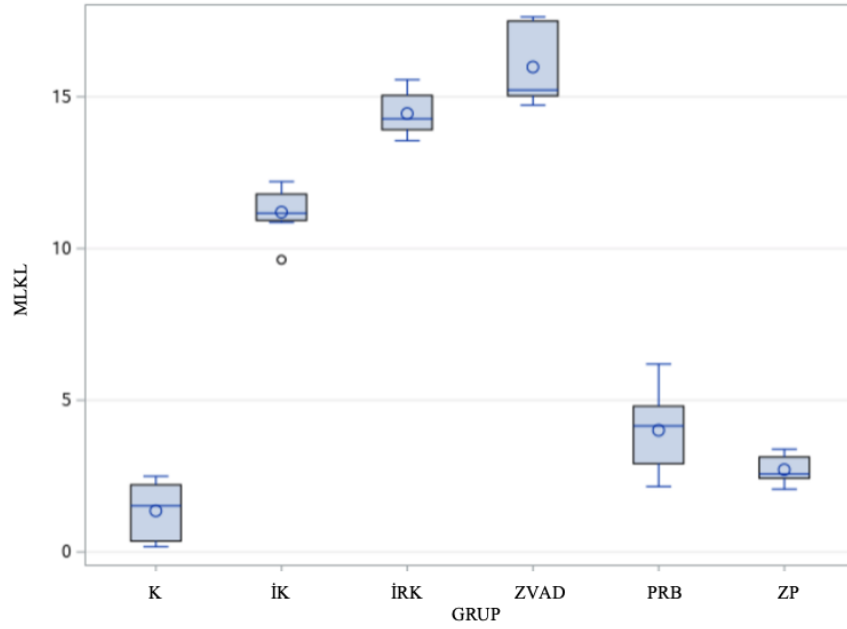
MLKL						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	p
Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Q2	Değeri
(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	(Q1-Q3)	
1.36 ± 0.98	11.20 ± 0.80	14.45 ± 0.73	15.98 ± 1.30	4.01 ± 1.38	2.71 ± 0.45	
1.52	11.16	14.28	15.22	4.15	2.57	<0.001*
(0.36-2.22)	(10.93-11.79)	(13.92-15.05)	(15.03-17.50)	(2.92-4.81)	(2.43-3.13)	

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma
Q1: 25. Persantil, Q2: Medyan, Q3: 75. Persantil
**: Kurskal-Wallis Test*

Tablo 4.12 MLKL gen ifadelerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırılmaları.

GRUP	Wilcoxon Z	DSCF Değeri	p-Değeri
K vs. İK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
K vs. PRB	-2.9406	4.1586	0.0385
K vs. ZP	-2.7851	3.9387	0.0598
İK vs. İRK	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. ZVAD	-3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZVAD	-2.3105	3.2675	0.1897
İRK vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
İRK vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. PRB	3.3607	4.7527	0.0101
ZVAD vs. ZP	3.3607	4.7527	0.0101
PRB vs. ZP	1.8904	2.6734	0.4080

DSCF: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner Yöntemi



Şekil 4.7 MLKL gen ifadeleri.

4.3. Beyin Dokularında Protein Düzeyleri

4.3.1. Kaspaz 3 protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *kaspaz 3* protein düzeyleri ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.13** ve **Şekil 4.8**'de; *kaspaz 3* protein düzeylerinin deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.14**'de verilmiştir.

Deney grupların kontrol grubu ile ikili karşılaştırılması sonucunda ZVAD (p=0.729) ve ZP (p=0.890)-gruplarının *kaspaz 3* protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken İK, İRK ve PRB gruplarının *kaspaz 3* protein düzeylerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde artış olduğu belirlendi (p<0.0001; her biri için). İK grubuna göre İRK grubu *kaspaz 3* protein düzeyinin istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu belirlendi (p<0.0001). İRK grubu ile tedavi grupları olan ZVAD, PRB ve ZP gruplarının karşılaştırılmasında bu gruplarda *kaspaz 3* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi (p<0.0001; her birinde). PRB grubu ile karşılaştırıldığında ZVAD ve ZP gruplarında *kaspaz 3* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu (p<0.0001; her biri için) belirlendi. ZP ile ZVAD gruplarının *kaspaz 3* protein düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=1.000).

Elde edilen istatistiksel sonuçlara göre iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin iskemik sürece göre *kaspaz 3* protein düzeyinin daha fazla arttırdığı belirlendi. Apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanımının *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımına göre iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan *kaspaz 3* protein düzeyini daha fazla azalttığı gözlemlendi. İki inhibitörün birlikte kullanılmasının iskemi-reperfüzyon sürecinde artan *kaspaz 3* protein düzeyini azalttığı ve bu sonucun Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanılması ile oluşan etkiyle aynı özelliğe sahip olduğu belirlendi.

Tablo 4.13 Deney gruplarında Kaspaz 3 protein düzeylerinin karşılaştırılması.

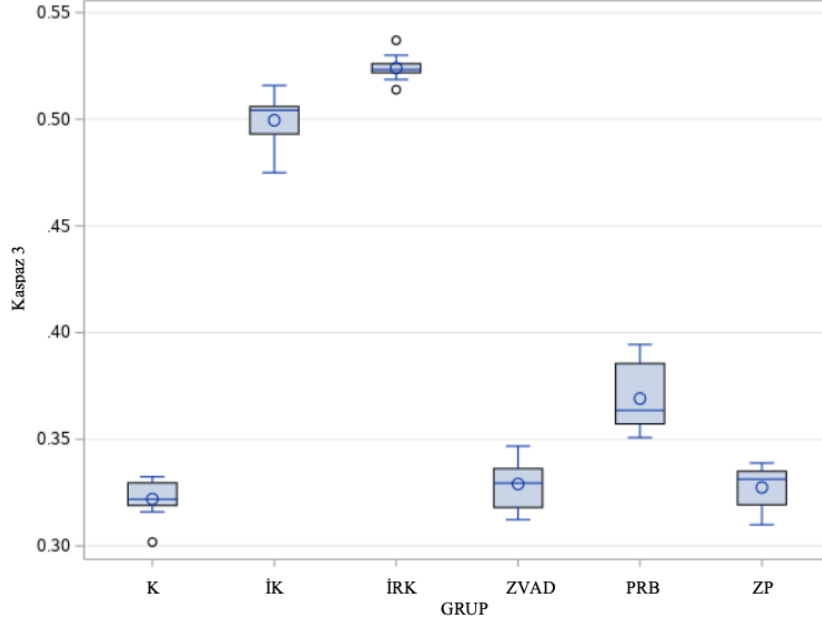
KASPAZ 3 (ng/mL)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	P
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
0.32 ± 0.009	0.50 ± 0.013	0.52 ± 0.006	0.33 ± 0.011	0.37 ± 0.016	0.33 ± 0.010	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.14 Kaspaz 3 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	0.729
K vs. PRB	<0.000
K vs. ZP	0.890
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	<0.000
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	1.000
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil 4.8 Kaspaz 3 protein düzeyleri.

4.3.2. Kaspaz 8 protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *kaspaz 8* protein düzeyleri ile ilgili bilgiler (ortalama \pm ss, 25. persantil, medyan ve 75. persantil bilgileri) **Tablo 4.15** ve **Şekil 4.9**'da, *kaspaz 8* protein düzeylerinin deney gruplarında ikili çoklu karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.16**'da verilmiştir.

Grupların *kaspaz 8* protein düzeylerinin K grubu ile karşılaştırılması sonucunda İK, İRK ve PRB gruplarının protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0.0001$ İK ve İRK için; $p = 0.048$ PRB için) belirlenirken, ZVAD ve ZP gruplarının protein düzeylerinin ise istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; her biri için). İK grubuna göre İRK grubunda *kaspaz 8* protein düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). İRK grubuna göre ZVAD, PRB ve ZP gruplarının *kaspaz 8* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; her biri için). PRB grubunun protein düzeyi hem ZVAD hem de ZP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; her biri için). ZP grubunda *kaspaz 8* protein düzeyinin ZVAD grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ($p > 0.0001$).

Yapılan değerlendirmeler sonucunda 2 saatlik iskemik sürecine göre iskemi sonrası 24 saatlik reperfüzyon sürecinde *kaspaz 8* protein düzeyinin artmaya devam ettiği ve hem apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk hem de *Pan1* inhibitörü olan probenecidin ayrı ayrı kullanılmasının artan *kaspaz 8* protein düzeyinin azalmasına yardımcı olduğu belirlenmiştir. Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılmasının *kaspaz 8* protein düzeyinin düşmesinde en uygun yöntem olduğu belirlendi.

Tablo 4.15 Deney gruplarında Kaspaz 8 protein düzeylerinin karşılaştırılması.

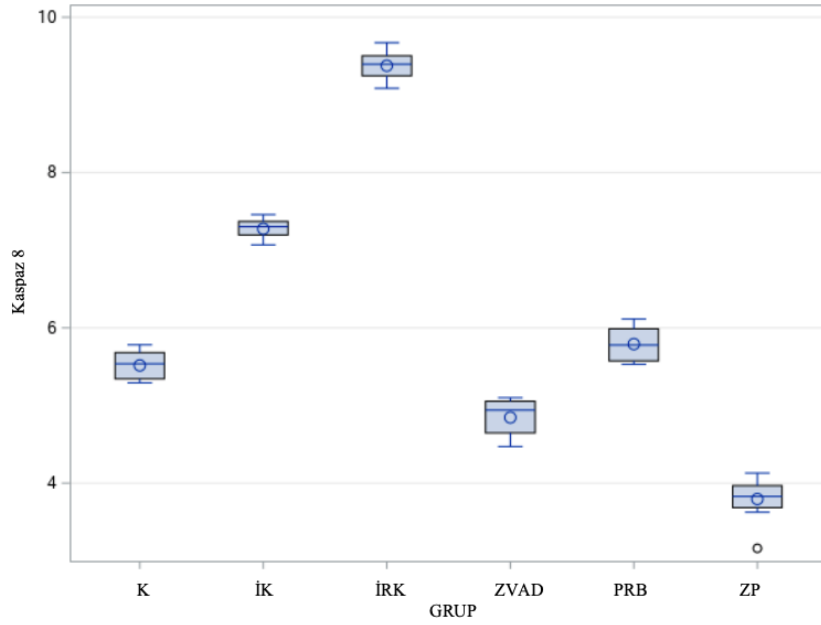
KASPAZ 8 (pmol/L)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	P
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
5.52 ± 0.178	7.28 ± 0.125	9.38 ± 0.190	4.85 ± 0.227	5.79 ± 0.207	3.79 ± 0.283	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.16 Kaspaz 8 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	0.048
K vs. ZP	<0.000
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	<0.000
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil 4.9 Kaspaz 8 protein düzeyleri.

4.3.3. *RIPK1* protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *RIPK1* protein düzeyi ile ilgili bilgiler Tablo 4.17 ve Şekil 4.10'da deney gruplarında *RIPK1* protein düzeyi ile ilişkili ikili karşılaştırma analizi sonuçları Tablo 4.18'de verilmiştir.

K grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda İK, İRK, ZVAD ve PRB gruplarında *RIPK1* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). K ve ZP gruplarının *RIPK1* protein düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.568$). İRK grubunda ilgili protein düzeyinin İK, PRB ve ZP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu, ZVAD grubuna göre ise düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$, her biri için). PRB ve ZP gruplarının *RIPK1* protein düzeylerinin ZVAD grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde az olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; **Tablo 4.18**).

Elde edilen istatistiksel sonuçlara göre iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinde iskemi sürecine göre dokuda bulunan *RIPK1* protein düzeyinin arttığı ve apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın İ/R aşamalarında kullanımının *RIPK1* protein düzeyinin yükselmesine sebep olduğu belirlendi. *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımının beyin İ/R sürecinde artan protein düzeyinin azalmasına neden olduğu gözlemlendi. Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılması İ/R sürecinde artan *RIPK1* protein düzeyini önemli ölçüde azaltarak oluşan doku hasarının gerilemesinde etkili olduğu belirlendi.

Tablo 4.17 Deney gruplarında *RIPK1* protein düzeylerinin karşılaştırılması.

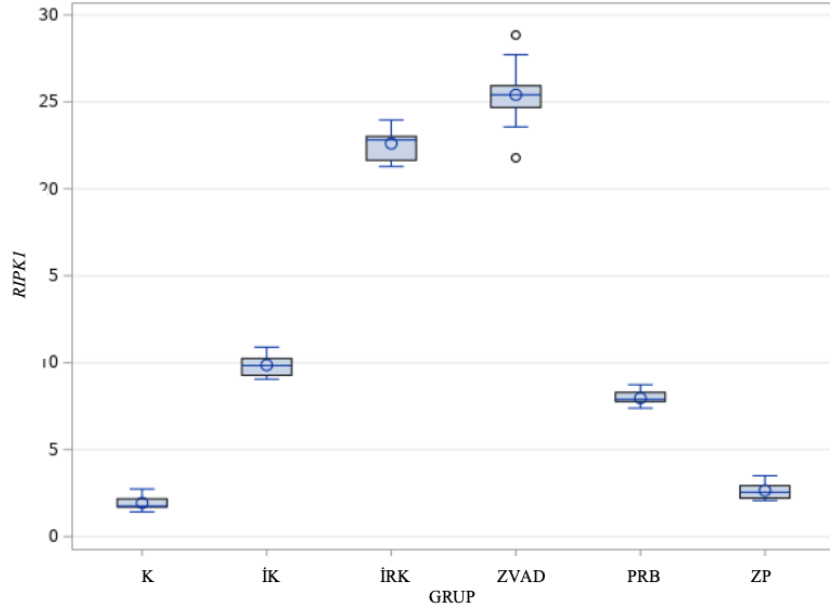
<i>RIPK1</i> (ng/L)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	p
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
1.93 ± 0.39	9.86 ± 0.63	22.60 ± 0.86	25.40 ± 1.96	7.95 ± 0.40	2.64 ± 0.48	<0.001*

Ort.: Ortalama, *S.S.:* Standart Sapma

*: Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.18 RIPK1 protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	<0.000
K vs. ZP	0.568
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	0.001
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil 4.10 RIPK1 protein düzeyleri.

4.2.4. *RIPK3* protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *RIPK3* protein düzeyi değerleri ile ilgili bilgiler Tablo 4.19 ve Şekil 4.11'de; *RIPK3* protein düzeyi değerlerinin deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.20**'da verilmiştir.

K grubu *RIPK3* protein düzeyi değerlerinin tüm grupların ilgili protein düzeyleri ile ikili karşılaştırılmaları sonucunda PRB grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0.781$) İK, İRK ve ZVAD gruplarının ilgili protein düzeylerinin istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu ($p<0.0001$; her biri için), ZP grubunun protein düzeyinin ise düşük olduğu belirlendi ($p<0.0001$). Ayrıca İRK grubunun *RIPK3* protein düzeyinin İK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). İRK grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalarda PRB ve ZP grubunun *RIPK3* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.0001$; her biri için). ZVAD grubunun protein düzeyinin İRK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.0001$). ZVAD grubuna göre PRB ve ZP grubu *RIPK3* protein düzeylerinin istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.0001$). PRB grubuna göre ZP grubu *RIPK3* protein düzeyinin istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu belirlendi. ($p<0.0001$; **Tablo 4.10**).

Elde edilen istatistiksel sonuçlara göre iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinde kan akımının yeniden sağlanması ile; iskemi sürecine göre, beyin dokusunda *RIPK3* protein düzeyinin attığı gözlemlendi. Apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın bu süreçte kullanılmasının *RIPK3* protein düzeyinin daha da yükselmesine sebep olduğu belirlendi. *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımının beyin İ/R sürecinde artan *RIPK3* protein düzeyinin azalmasına neden olduğu ve bu inhibitörün Z-VAD-fmk ile birlikte kullanılmasının

İ/R sürecinde artan *RIPK3* protein düzeyini önemli ölçüde azaltarak dokuda oluşan hasarı azalttığı belirlendi.

Tablo 4.19 Deney gruplarında *RIPK3* protein düzeylerinin karşılaştırılması.

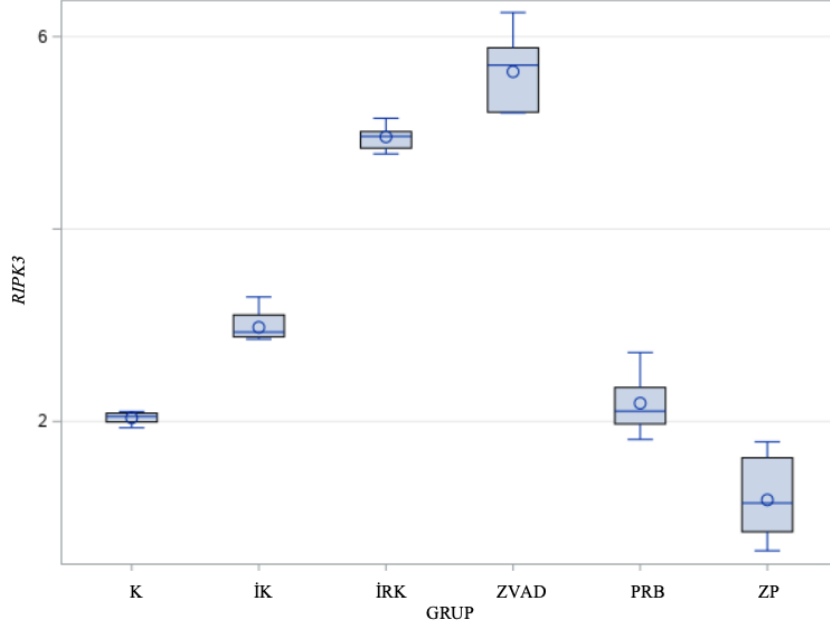
<i>RIPK3</i> (ng/L)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	p
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
2.03 ± 0.060	2.98 ± 0.145	4.96 ± 0.118	5.64 ± 0.351	2.19 ± 0.292	1.18 ± 0.408	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.20 *RIPK3* protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	0.781
K vs. ZP	<0.000
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	<0.000
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil 4.11 RIPK3 protein düzeyleri.

4.2.5. MLKL protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *MLKL* protein düzeyi değerleri ile ilgili bilgiler **Tablo 4.21** ve **Şekil 4.12**'de; *MLKL* protein düzeylerinin deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.22**'de verilmiştir.

K grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ZP grubu *MLKL* protein düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0.169$), İK, İRK, ZVAD ve PRB gruplarının *MLKL* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. İRK grubunun ilgili protein düzeyi İK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.0001$). PRB ve ZP gruplarının ilişkili protein düzeyleri ZVAD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ($p<0.0001$; her biri için) ZP ve PRB gruplarının *MLKL* protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0.696$) belirlenmedi (**Tablo 4.12**).

Yapılan çalışmalar sonucunda iskemi sürecinin *MLKL* protein düzeyini arttırdığı ve bu iskemi sürecini takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde *MLKL* protein düzeyinin daha fazla arttığı belirlendi. Kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk'nın İ/R aşamasında kullanımını *MLKL* protein düzeyini artırdığı, PAN1 inhibitörü olan probenecid kullanımının ise bu protein düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca her iki inhibitörün birlikte kullanımını İ/R sürecinde artan *MLKL* protein düzeyini düşürerek oluşan doku hasarının azalmasına neden olmuştur.

Tablo 4.21 Deney gruplarında *MLKL* protein düzeylerinin karşılaştırılması.

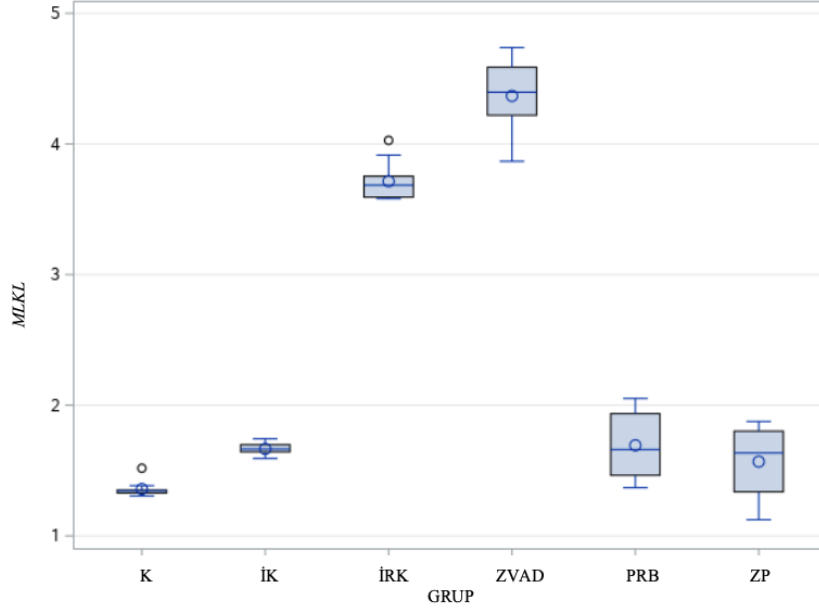
<i>MLKL</i> (pg/mL)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	p
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
1.36 ± 0.059	1.67 ± 0.044	3.71 ± 0.151	4.37 ± 0.263	1.69 ± 0.245	1.57 ± 0.253	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.22 *MLKL* protein düzeylerinin deney gruplarında DSCF yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	0.009
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	0.004
K vs. ZP	0.169
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	1.000
İK vs. ZP	0.865
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	0.696



Şekil 4.12 MLKL protein düzeyleri.

4.2.6. *TNF- α* protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *TNF- α* protein düzeyi değerleri ile ilgili bilgiler **Tablo 4.23** ve Şekil 4.13'de; *TNF- α* protein düzeylerinin deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.24**'de verilmiştir.

Kontrol grubunun *TNF- α* protein düzeyinin diğer gruplar ile yapılan ikili karşılaştırılmaları sonucunda, İK, İRK, ZVAD, PRB ve ZP gruplarının *TNF- α* protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0.025$ ZP grubu, $p<0.0001$ diğer gruplar). İK grubunun *TNF- α* protein düzeyinin İRK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulundu ($p<0.001$). İRK grubunun *TNF- α* protein düzeyi ile ZVAD grubunun *TNF- α* protein düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmezken ($p=0.758$), İRK grubuna göre PRB ve ZP gruplarında ilişkili protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.0001$; her biri için). ZVAD grubu ile ikili karşılaştırmalar sonucunda hem ZP hem de PRB grubu

TNF- α protein düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.000$). Ayrıca ZP grubunun ilişkili protein düzeyinin PRB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($p < 0.001$).

Yapılan istatistiksel çalışmalara göre beyin dokusunda iki saatlik iskemi sürecinde *TNF- α* protein düzeyinin artmaya başladığı ve 24 saatlik reperfüzyon sürecinde de *TNF- α* protein düzeyi artışının devam ettiği belirlendi. Ayrıca İ/R sürecinde apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın kullanımının *TNF- α* protein düzeyini etkilemediği belirlendi. *Pan1* inhibitörü olan probenecid *TNF- α* protein düzeyini azaltmakla birlikte, dokularda *TNF- α* protein düzeyini en fazla azaltan uygulamanın hem apoptoz inhibitörü hem de *Pan1* inhibitörünün birlikte uygulanması olduğu belirlendi.

Tablo 4.23 Deney gruplarında *TNF- α* protein düzeylerinin karşılaştırılması

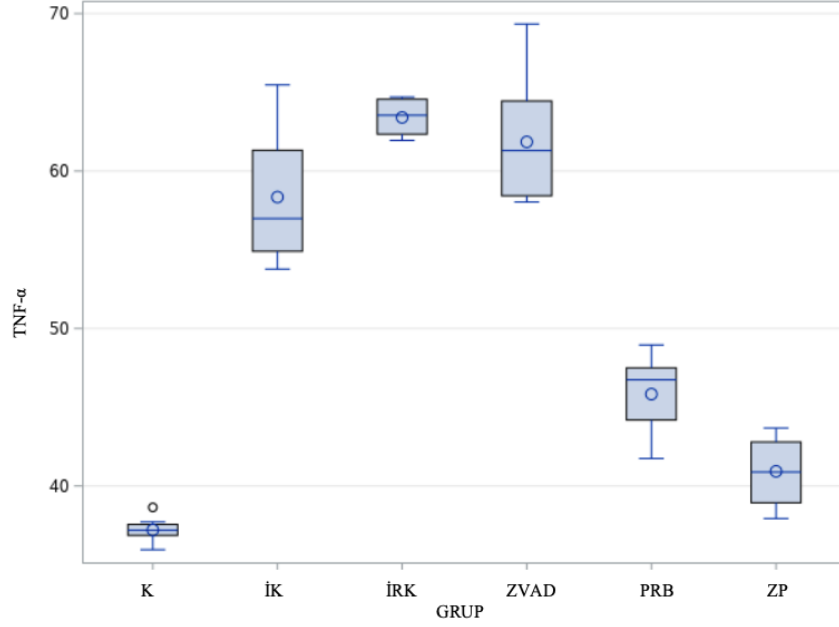
<i>TNF-α</i> (ng/L)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	P
Ort. \pm S.S.	Ort. \pm S.S.	Ort. \pm S.S.	Ort. \pm S.S.	Ort. \pm S.S.	Ort. \pm S.S.	Değeri
37.21 \pm 0.73	58.35 \pm 3.73	63.40 \pm 1.07	61.85 \pm 3.70	45.83 \pm 2.46	40.93 \pm 2.13	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.24 *TNF- α* protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	<0.000
K vs. ZP	0.025
İK vs. İRK	0.001
İK vs. ZVAD	0.040
İK vs. PRB	<0.000
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	0.758
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	0.001



Şekil 4.13 TNF- α protein düzeyleri.

4.2.7. PARP protein düzeyi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, deney gruplarından elde edilen *PARP* protein düzeyi değerleri ile ilgili bilgiler **Tablo 4.25** ve Şekil 4.14'de; *PARP* protein düzeylerinin deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.26**'de verilmiştir.

K grubunun *PARP* protein düzeyinin diğer gruplar ile ikili karşılaştırılması sonucunda tüm grupların protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (İK, İRK, ZVAD ve PRB gruplarında $p < 0.0001$, ZP grubu $p = 0.036$). İRK grubunun *PARP* protein düzeyi İK grubunun protein düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenirken, ZVAD, PRB, ZP gruplarının ilişkili protein düzeylerinin düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; her biri için). PRB ve ZVAD gruplarının *PARP* protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamadı ($p = 0.069$). ZP grubu *PARP* protein düzeyinin hem ZVAD hem de PRB gruplarının protein

düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$; her biri için).

Yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda hem iskemi hem de iskemiye takip eden reperfüzyon süreçlerinin *PARP* protein düzeyini arttırdığı ve iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin iskemi sürecinde artan *PARP* protein düzeyini daha fazla arttırdığı belirlendi. İskemi reperfüzyon sürecinde apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın ve *Pan1* inhibitörü olan probenecidin ayrı ayrı kullanılması İ/R sürecinde artan *PARP* protein düzeyini azalttı. Elde edilen sonuçlara göre her iki inhibitörün birlikte kullanılması *PARP* protein düzeyini en etkili şekilde düşürdü.

Tablo 4.25 Deney gruplarında *PARP* protein düzeylerinin karşılaştırılması.

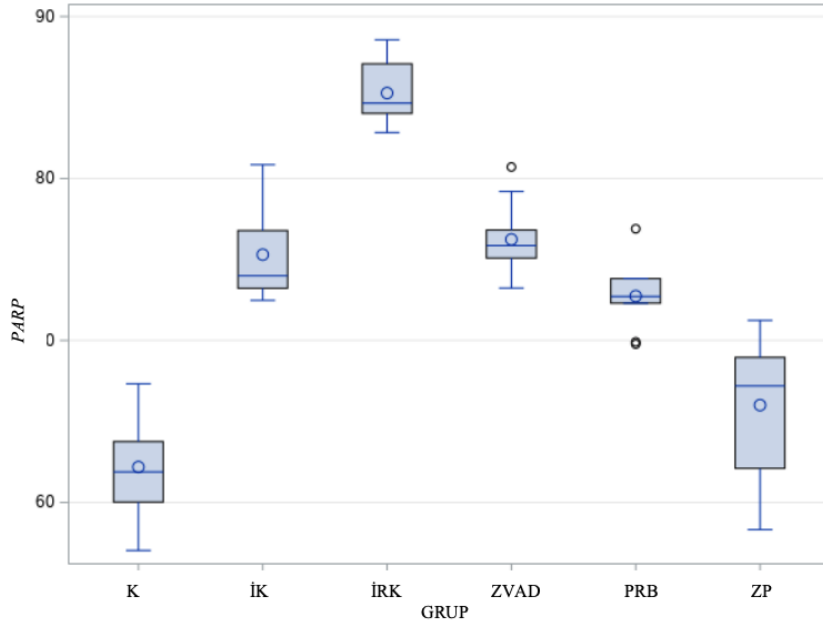
<i>PARP</i> (µmol/L)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	p
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
62.19 ± 2.99	75.30 ± 2.76	85.28 ± 1.80	76.24 ± 2.29	72.74 ± 2.03	66.01 ± 4.11	<0.001*

Ort.: Ortalama, *S.S.:* Standart Sapma

*: Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.26 *PARP* protein düzeylerinin deney gruplarında Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	P-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	<0.000
K vs. PRB	<0.000
K vs. ZP	0.036
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	0.973
İK vs. PRB	0.321
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	0.069
ZVAD vs. ZP	<0.000
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil 4.14 PARP protein düzeyleri.

4.4 Histoloji Bulguları

Çalışmamızda deney gruplarından elde edilen beyin doku örneklerinde iskemik durumun neden olduğu morfolojik ve hüresel değişim ile birlikte kullanılan inhibitörlerin bu değişimlerdeki etkileri H&E boyama yöntemi ile incelendi. Bu incelemede tüm gruplardaki örnekler nekrotik hücre, apoptotik hücre, vasküler kongesyon ve vasküler dilasyon bakımından değerlendirildi (**Tablo 4.27, Tablo 4.28 ve Şekil 4.15**).

Yapılan değerlendirmeler sonucunda K grubuna ait sıçan beyinlerinde normal görünümlü nöronlar ve glial hücreler gözlemlendi. Bu gruptaki örneklerde nekrotik ve apoptotik hücelere rastlanmadı. Vasküler kongesyon ve dilasyon bakımından K grubu hücrelerinde orta ya da ağır hasara rastlanmadı. İK grubuna ait dokularda kortikal alanda hasar, çok sayıda ağır hasarlı nekrotik hücre yapıları ve orta hasarlı apoptotik hücre yapıları belirlendi. Ayrıca İK grubu dokularında hafif ve orta hasarlı vasküler kongesyon belirlenirken ağır hasarlı vasküler

dilasyon yapıları belirlendi. İRK grubu doku örneklerinde kortikal alanda normal nöronlar yanında çok sayıda ağır hasarlı apoptotik ve nekrotik hücre gözlemlendi. Vasküler kongesyon ve dilasyon bakımından İRK grubu hücrelerinde çok sayıda orta ya da ağır hasara rastlandı. ZVAD grubundaki dokularda kortikal alanda normal nöronlar yanında çok sayıda nekrotik hücre belirlendi. Bu grupta pan kaspaz inhibitörünün kullanılması sonucunda hücrelerde apoptotik hücre yüzdesini azalırken nekrotik hücre yüzdesinin arttığı belirlendi. PRB grubundaki beyin dokularında kortikal alanda az sayıda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler ile birlikte hafif ve orta derecede vasküler kongesyon ve dilasyon yapıları gözlemlendi. ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda nekrotik hücre görülmekle birlikte kontrol grubuna yakın nöron yapıları ve glial hücreler belirlendi (**Tablo 4.27, Şekil 4.15**).

Yapılan değerlendirmelerin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda İK grubunda ağır hasarlı nekrotik hücrelerin, İRK grubunda ise ağır hasarlı apoptotik hücrelerin daha fazla olduğu belirlendi. Ayrıca İRK grubunda vasküler kongesyonun diğer gruplardan daha fazla olduğu gözlemlendi. PRB grubundaki beyin dokularında yapılan değerlendirmeler sonucunda İK ve İRK grubuna oranla azalmış hasar ve kontrol grubuna yakın nöron yapıları ve glial hücreler belirlendi. ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda nekrotik hücre görülmekte olup, yapılan değerlendirmeler sonucunda nekrotik hücre, apoptotik hücre, vasküler kongesyon ve dilasyon bakımından kontrol grubuna yakın olduğu belirlendi (**Tablo 4.28**).

Tablo 4.27 Beyin doku örneklerinin H&E boyama yöntemi ile değerlendirilmesi (Grup içi)

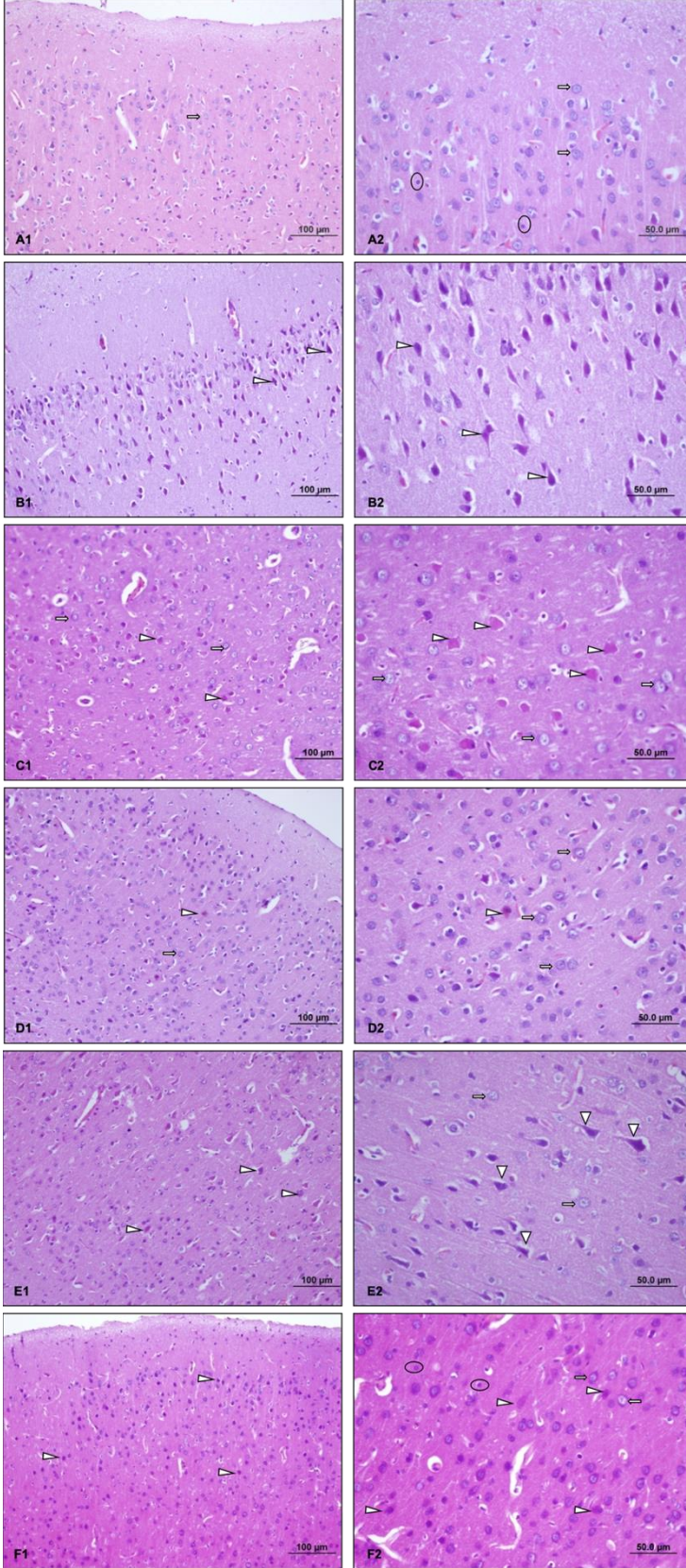
			SKOR				
			0	1	2	3	
Nekrotik Hücre	IK	n	0a	0a	4a, b	6b	
		%	0	0	17,4	60	
	IRK	n	0a	1a	6a	3a	
		%	0	8,3	26,1	30	
	K	n	10a	0b	0b	0b	
		%	66,7	0	0	0	
	PRB	n	0a	3a	7a	0a	
		%	0	25	30,4	0	
	ZP	n	5a	4a	1a	0a	
		%	33,3	33,3	4,3	0	
	ZVAD	n	0a	4a	5a	1a	
		%	0	33,3	21,7	10	
	Toplam		n	15	12	23	10
			%	100	100	100	100
Apoptotik Hücre	IK	n	0a	0a	10b	0a	
		%	0	0	58,8	0	
	IRK	n	0a	0a	2a	8b	
		%	0	0	11,8	100	
	K	n	10a	0b	0b	0a, b	
		%	47,6	0	0	0	
	PRB	n	1a	5a	4a	0a	
		%	4,8	35,7	23,5	0	
	ZP	n	4a	5a	1a	0a	
		%	19	35,7	5,9	0	
	ZVAD	n	6a	4a	0a	0a	
		%	28,6	28,6	0	0	
	Toplam		n	21	14	17	8
			%	100	100	100	100
Vasküler Kongesyon	IK	n	0a	7a	3a	0a	
		%	0	26,9	23,1	0	
	IRK	n	0a	3a, b	5b, c	2c	
		%	0	11,5	38,5	100	
	K	n	9a	1b	0b	0a, b	
		%	47,4	3,8	0	0	
	PRB	n	3a	6a	1a	0a	
		%	15,8	23,1	7,7	0	
	ZP	n	7a	3a	0a	0a	
		%	36,8	11,5	0	0	
	ZVAD	n	0a	6a	4a	0a	
		%	0	23,1	30,8	0	
	Toplam		n	19	26	13	2
			%	100	100	100	100
Vasküler Dilasyon	IK	n	0a	3a, b	3a, b	4b	
		%	0	13,6	27,3	50	
	IRK	n	0a	2a, b	4b	4b	
		%	0	9,1	36,4	50	
	K	n	9a	1b	0b	0a, b	
		%	47,4	4,5	0	0	
	PRB	n	2a	8a	0a	0a	
		%	10,5	36,4	0	0	
	ZP	n	8a	2a	0a	0a	
		%	42,1	9,1	0	0	
	ZVAD	n	0a	6a, b	4b	0a, b	
		%	0	27,3	36,4	0	
	Toplam		n	19	22	11	8
			%	100	100	100	100

Her bir grup içinde birbirinden farklı olan skorlar 0.05 anlamlılık düzeyinde farklı harflerle gösterilmiştir. Karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesi yapılarak gerçekleştirildi. *Skor: 0= hasar yok, 1=az hasar, 2=orta hasar, 3= ağır hasar

Tablo 4.28 Beyin doku örneklerinin H&E boyama yöntemi ile değerlendirilmesi (Gruplar arası)

			GRUP					
			IK	IRK	K	PRB	ZP	ZVAD
Nekrotik Hücre	0	n	0a	0a	10b	0a	5a, b	0a
		%	0	0	100	0	50	0
	1	n	0a	1a	0a	3a	4a	4a
		%	0	10	0	30	40	40
	2	n	4a, b	6a, b	0b	7a	1a, b	5a, b
		%	40	60	0	70	10	50
	3	n	6a	3a	0a	0a	0a	1a
		%	60	30	0	0	0	10
Toplam		n	10	10	10	10	10	10
		%	100	100	100	100	100	100
Apoptotik Hücre	0	n	0a	0a	10b	1a	4a, b	6a, b
		%	0	0	100	10	40	60
	1	n	0a	0a	0a	5a	5a	4a
		%	0	0	0	50	50	40
	2	n	10a	2b	0b	4a, b	1b	0b
		%	100	20	0	40	10	0
	3	n	0a	8b	0a	0a	0a	0a
		%	0	80	0	0	0	0
Toplam		n	10	10	10	10	10	10
		%	100	100	100	100	100	100
Vasküler Kongesyon	0	n	0a	0a	9b	3a, b	7b	0a
		%	0	0	90	30	70	0
	1	n	7a	3a	1a	6a	3a	6a
		%	70	30	10	60	30	60
	2	n	3a	5a	0a	1a	0a	4a
		%	30	50	0	10	0	40
	3	n	0a	2a	0a	0a	0a	0a
		%	0	20	0	0	0	0
Toplam		n	10	10	10	10	10	10
		%	100	100	100	100	100	100
Vasküler Dilasyon	0	n	0a	0a	9b	2a, c	8b, c	0a
		%	0	0	90	20	80	0
	1	n	3a, b	2a, b	1b	8a	2a, b	6a, b
		%	30	20	10	80	20	60
	2	n	3a	4a	0a	0a	0a	4a
		%	30	40	0	0	0	40
	3	n	4a	4a	0a	0a	0a	0a
		%	40	40	0	0	0	0
Toplam		n	10	10	10	10	10	10
		%	100	100	100	100	100	100

Her bir skor değerinde birbirinden farklı olan gruplar 0.05 anlamlılık düzeyinde farklı harflerle gösterilmiştir. Karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesi yapılarak gerçekleştirildi.
*Skor: 0= hasar yok, 1=az hasar, 2=orta hasar, 3= ağır hasar



Şekil 4.15 Tüm deney gruplarına ait sıçan beyinlerinin ışık mikroskopik görüntüleri

(Bar: 100µm, 50.0µm).

A1-A2: K grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (→) ve glial hücreler (O) izlenmekte.

B1-B2: İK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda hasar ve çok sayıda nekrotik hücre yapıları (▶) dikkat çekmekte.

C1-C2: İRK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal nöronlar (→) yanında çok sayıda nekrotik hücre (▶) gözlenmekte.

D1-D2: PRB grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücre (▶) görülmekle birlikte İK ve İRK grubuna oranla azalmış hasar ve kontrol grubuna yakın nöron yapıları (→) ve glial hücreler gözlenmekte.

E1-E2: ZVAD grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal nöronlar (→) yanında çok sayıda nekrotik hücre (▶) gözlenmekte.

F1-F2: ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda nekrotik hücre (▶) görülmekle birlikte İK ve İRK grubuna oranla azalmış hasar ve kontrol grubuna yakın nöron yapıları (→) ve glial hücreler gözlenmekte.

4.5 İmmünohistokimyasal Çalışma Bulguları

4.5.1 Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama bulguları

Kaspaz 3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama çalışmalarından elde edilen verilerin değerlendirmeleri sonucunda hem İK grubun hem de iskemi ve iskemiye takip eden reperfüzyon süreçlerini kapsayan İRK grubu beyin doku örneklerinde *kaspaz 3* antikoru ile işaretlenen hücre oranlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca *kaspaz 3* antikoru işaretli hücrelerde yoğun boyanan hücre oranının iskemi ve reperfüzyon oluşturulan İRK grubunda daha fazla olduğu belirlenirken, İK grubunda orta boyanan hücre oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın kullanılması nedeni ile ZVAD grubunda *kaspaz 3* antikoru ile yoğun olarak işaretlenen hücelere rastlanmadı. *Pan1* inhibitörü kullanılan PRB grubunda *kaspaz 3* antikoru ile işaretlenen hücre oranının İRK grubuna göre daha düşük olduğu ve bu işaretlenen hücrelerin yoğun olarak işaretlenmediği belirlendi. İRK grubuna kıyasla ZP grubunda *kaspaz 3* antikoru ile işaretlenen hücre oranının daha düşük olduğu ve boyanma yoğunluğunun İRK ve PRB gruplarından daha az olduğu belirlendi (**Tablo 4.29, Şekil 4.16**).

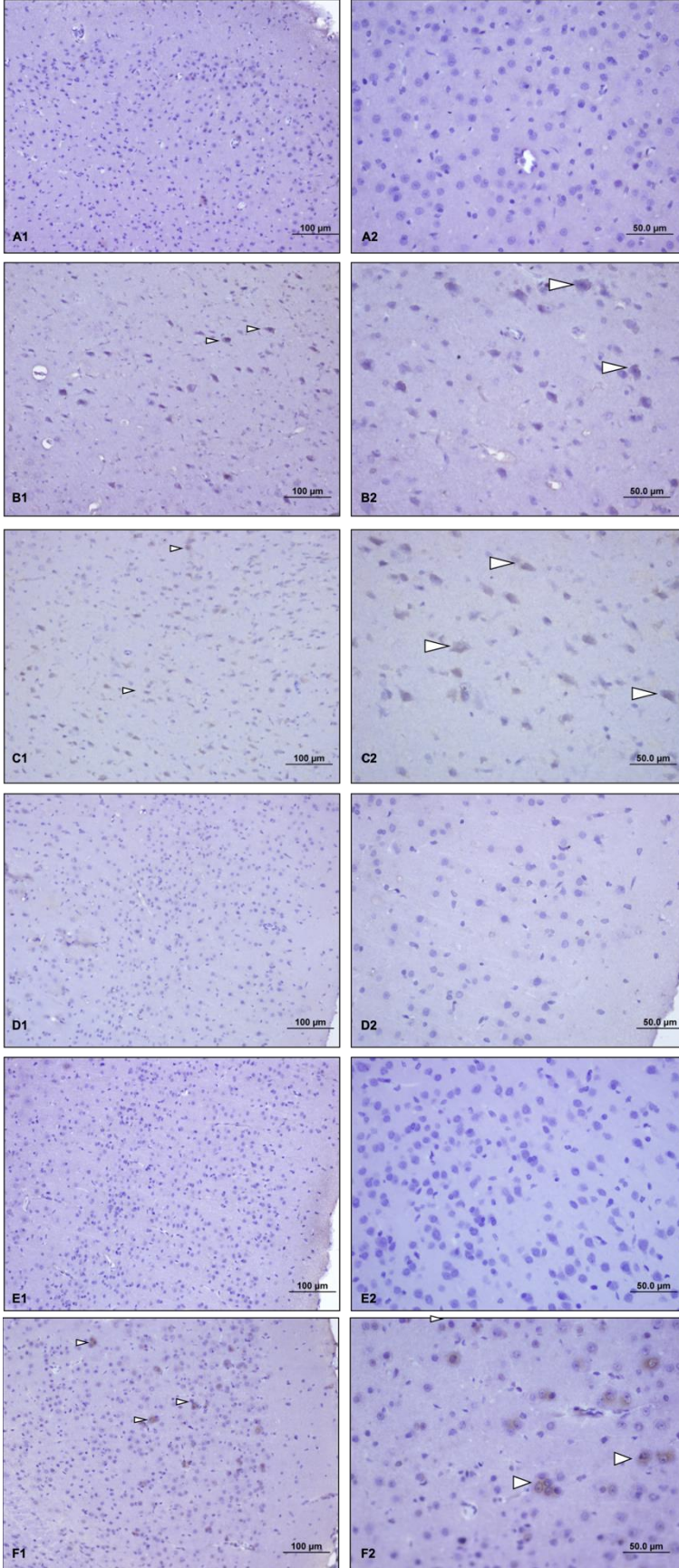
Yapılan çalışma sonucunda *kaspaz 3* ifadesinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve pan kaspaz inhibitörünün kullanıldığı ZVAD ve ZP gruplarında kontrol grubuna en yakın *kaspaz 3* ifadesine ulaştığı belirlendi.

Tablo 4.29 Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

GRUP	Karşılaştırma	Kaspaz 3 (%)				p-değeri
		-	+	++	+++	
K	Grup içi	100	0	0	0	<0.0001*
	Gruplar arası	47.62	0	0	0	
İK	Grup içi	0	30	30	40	
	Gruplar arası	0	20	27.27	30.77	
İRK	Grup içi	0	0	10	90	
	Gruplar arası	0	0	9.09	69.23	
ZVAD	Grup içi	80	20	0	0	
	Gruplar arası	38.10	13.33	0	0	
PRB	Grup içi	0	40	60	0	
	Gruplar arası	0	26.67	54.55	0	
ZP	Grup içi	30	60	10	0	
	Gruplar arası	14.29	40	9.09	0	

Skorlama -: yok, +: hafif dağılım, ++: orta dağılım ve +++: yoğun dağılım

*: Fisher's Exact Test



Şekil 4.16 *Kaspaz 3* antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.

(Bar: 100µm, 50.0µm)

A1-A2: K grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda *kaspaz 3* negatif boyanma dikkat çekmekte.

B1-B2: İK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *kaspaz 3* pozitif boyanma (▶) dikkat çekmekte.

C1-C2: İRK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *kaspaz 3* pozitif boyanma (▶) dikkat çekmekte.

D1-D2: PRB grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda hücrede gözlenen *kaspaz 3* negatif boyanma dikkat çekmekte.

E1-E2: ZVAD grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *kaspaz 3* negatif boyanma (▶) dikkat çekmekte.

F1-F2: ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda hücrede gözlenen *kaspaz 3* pozitif boyanma (▶) dikkat çekmekte.

4.5.2 Kaspaz 8 antikoru ile İmmünohistokimyasal boyama sonuçları

Kaspaz 8 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama çalışmalarından elde edilen verilerin değerlendirmeleri sonucunda kontrol grubuna göre iskemi ve iskemiye takip eden reperfüzyon süreçlerini kapsayan İRK grubu beyin doku örneklerinde *kaspaz 8* antikoru ile işaretlenen hücre oranının daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca *kaspaz 8* antikoru ile işaretli hücrelerde yoğun boyanan hücre oranının iskemi ve reperfüzyon oluşturulan İRK grubunda daha fazla olduğu belirlenirken İK grubunda yoğun işaretlenmiş hücreler gözlemlendi. Kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın kullanılması nedeni ile ZVAD grubunda *kaspaz 8* antikoru ile yoğun olarak işaretlenen hücelere rastlanmadı. *Pan1* inhibitörü kullanılan PRB grubunda *kaspaz 8* antikoru ile işaretlenen hücre oranının İRK grubuna göre daha düşük olduğu ve bu işaretlenen hücrelerin az ya da orta derecede işaretlendiği belirlendi. ZP grubunda *kaspaz 8* antikoru ile işaretlenen hücre oranının İRK grubuna göre daha düşük olduğu ve ZVAD grubu ile aynı özellikleri göstererek kontrol grubuna en yakın sonuçları gösterdiği belirlendi (**Tablo 4.30, Şekil 4.17**).

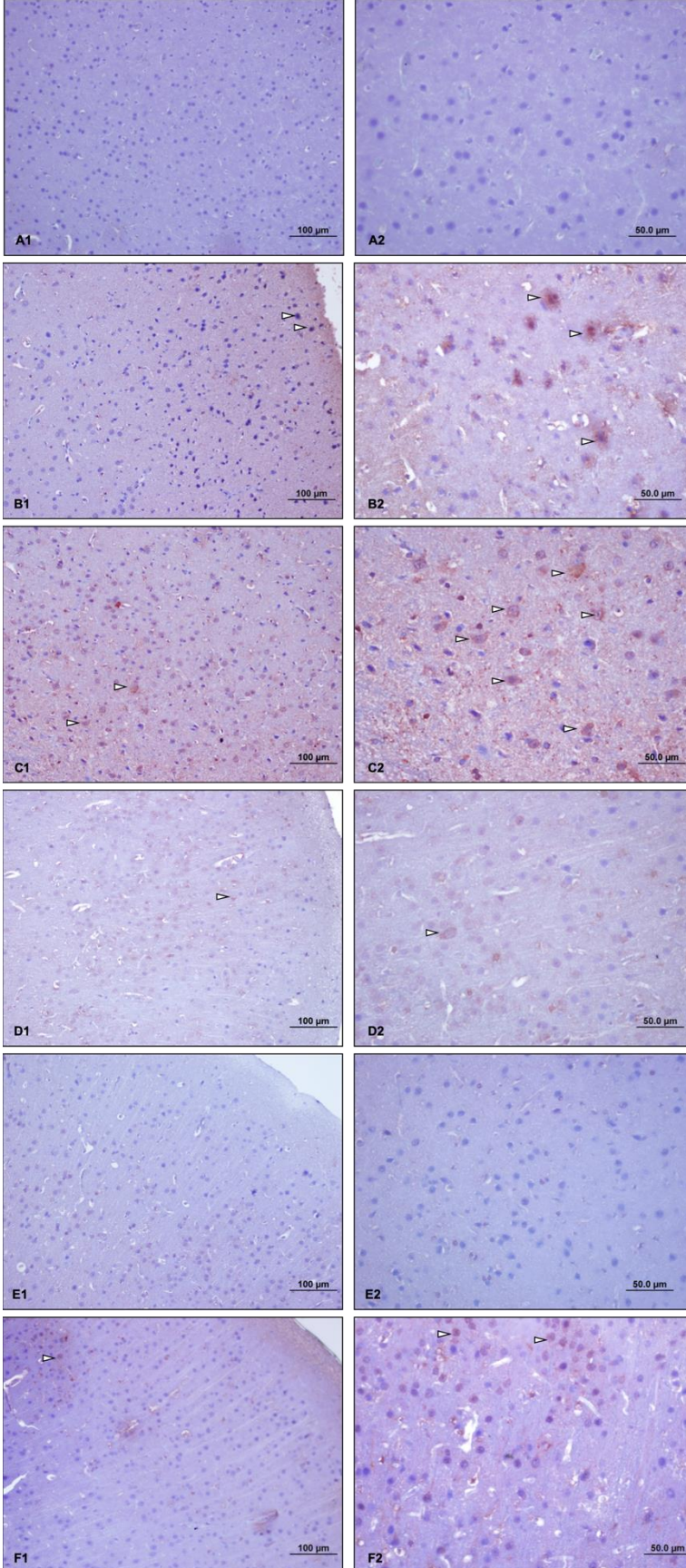
Yapılan değerlendirmeler sonucunda *kaspaz 8* ifadesinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve pan kaspaz inhibitörünün kullanıldığı ZVAD ve ZP gruplarında kontrol grubuna en yakın *kaspaz 8* ifadesine ulaştığı belirlendi.

Tablo 4.30 Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

GRUP	Karşılaştırma	KASPAZ 8 (%)				p-değeri
		-	+	++	+++	
K	Grup içi	100	0	0	0	<0.0001*
	Gruplar arası	41.67	0	0	0	
İK	Grup içi	0	30	70	0	
	Gruplar arası	0	21.43	46.67	0	
İRK	Grup içi	0	0	30	70	
	Gruplar arası	0	0	20	100	
ZVAD	Grup içi	90	10	0	0	
	Gruplar arası	37.50	7.14	0	0	
PRB	Grup içi	0	60	40	0	
	Gruplar arası	0	42.86	26.67	0	
ZP	Grup içi	50	40	10	0	
	Gruplar arası	20.83	28.57	6.67	0	

Skorlama -: yok, +: hafif dağılım, ++: orta dağılım ve +++: yoğun dağılım

*: Fisher's Exact Test



Şekil 4.17 *Kaspaz 8 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.*

(Bar: 100µm, 50.0µm)

A1-A2: K grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda Kaspas 8 negatif boyanma dikkat çekmekte.

B1-B2: İK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda Kaspas 8 pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

C1-C2: İRK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda kaspas 8 pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

D1-D2: PRB grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda hücrede gözlenen kaspas 8 pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

E1-E2: ZVAD grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda kaspas 8 negatif boyanma dikkat çekmekte.

F1-F2: ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda az sayıda hücrede gözlenen kaspas 8 pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

4.5.3 RIPK3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama bulguları

RIPK3 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama çalışmalarından elde edilen verilerin değerlendirmeleri sonucunda kontrol grubuna göre iskemi ve iskemiye takip eden reperfüzyon süreçlerini kapsayan İRK grubu beyin doku örneklerinde hem *RIPK3* antikoruna ile işaretlenen hücre oranının daha yüksek olduğu hem de *RIPK3* işaretli hücrelerin daha yoğun boyandığı belirlendi. Kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın kullanılması nedeni ile ZVAD grubunda *RIPK3* antikoruna ile yoğun olarak işaretlenen hücrelerin bulunduğu ve bu grupta *RIPK3* ifadesinin de K grubuna göre arttığı belirlendi. *Pan1* inhibitörü kullanılan PRB grubunda *RIPK3* antikoruna ile işaretlenen hücre oranının İRK ve ZVAD grubuna göre daha düşük olduğu ve bu işaretlenen hücrelerin az ya da orta derecede işaretlendiği belirlendi. ZP grubunda *RIPK3* antikoruna ile işaretlenen hücre oranının İRK ve ZVAD grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi. (**Tablo4.31; Şekil 4.18**).

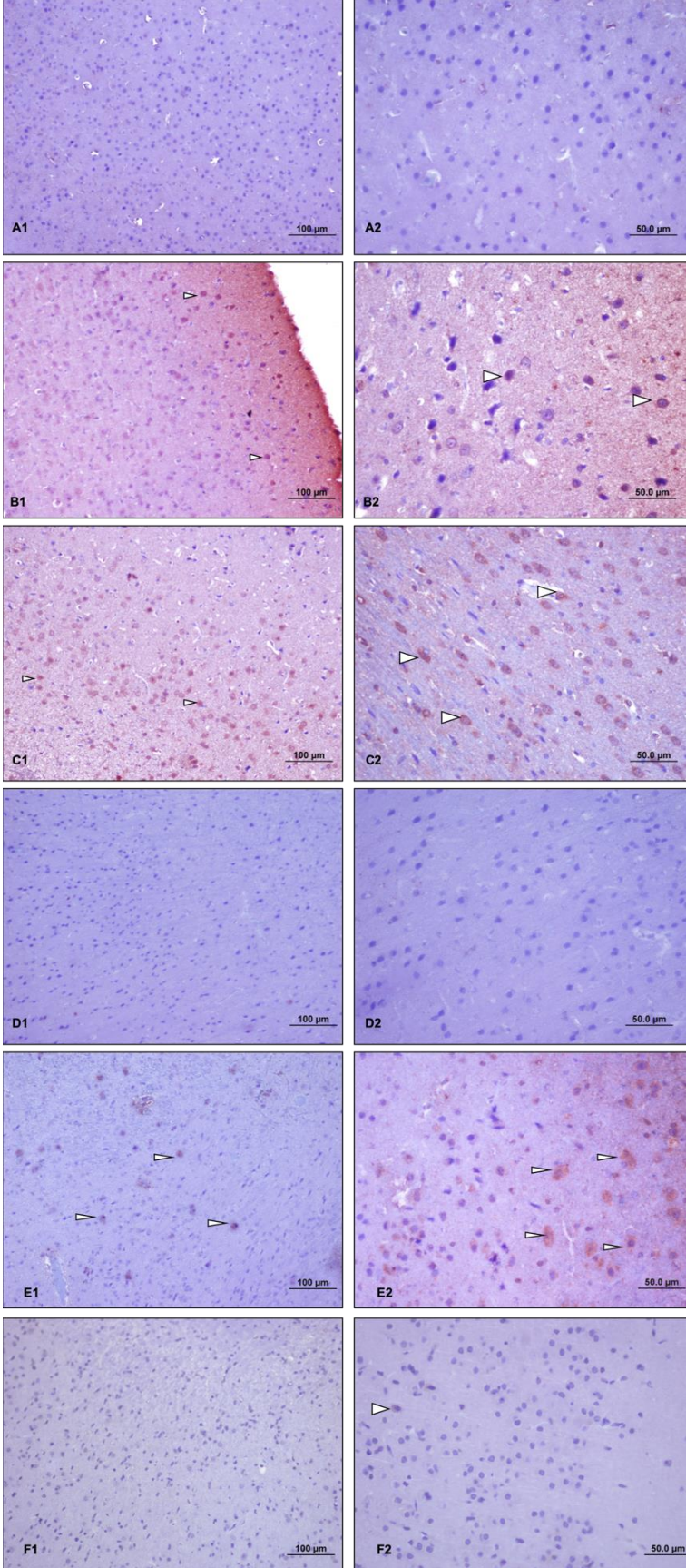
Yapılan değerlendirmeler sonucunda *RIPK3* ifadesinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve *Pan1* inhibitörünün kullanıldığı PRB grubunda kontrol grubuna en yakın *RIPK3* ifadesine ulaştığı gözlemlendi.

Tablo 4.31 RIPK3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

GRUP	Karşılaştırma	RIPK3				p-değeri
		-	+	++	+++	
K	Grup içi	100	0	0	0	<0.0001*
	Gruplar arası	58.82	0	0	0	
İK	Grup içi	0	20	40	40	
	Gruplar arası	0	15.38	26.67	26.67	
İRK	Grup içi	0	0	30	70	
	Gruplar arası	0	0	20	46.67	
ZVAD	Grup içi	0	10	50	40	
	Gruplar arası	0	7.69	33.33	26.67	
PRB	Grup içi	60	30	10	0	
	Gruplar arası	35.29	23.08	6.67	0	
ZP	Grup içi	10	70	20	0	
	Gruplar arası	5.88	53.85	13.33	0	

Skorlama -: yok, +: hafif dağılım, ++: orta dağılım ve +++: yoğun dağılım

*: Fisher's Exact Test



Şekil 4.18 RIPK3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.

(Bar: 100µm, 50.0µm).

A1-A2: K grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda *RIPK3* negatif boyanma dikkat çekmekte.

B1-B2: İK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *RIPK3* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

C1-C2: İKR grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *RIPK3* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

D1-D2: PRB grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda *RIPK3* negatif boyanma dikkat çekmekte.

E1-E2: ZVAD grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda *RIPK3* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

F1-F2: ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda birkaç hücrede gözlenen *RIPK3* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

4.5.4 *MLKL* antikoru ile immünohistokimyasal boyama bulguları

MLKL antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama çalışmalarından elde edilen verilerin değerlendirmeleri sonucunda kontrol grubuna göre iskemi ve iskemiye takip eden reperfüzyon süreçlerini kapsayan İRK grubu beyin doku örneklerinde hem *MLKL* antikoru ile işaretlenen hücre oranının daha yüksek olduğu belirlendi. Aynı zamanda bu örneklerde yoğun boyanmaların belirlenmesi bu grupta *MLKL* ifadesinin en fazla olduğu grup olduğunu gösterdi. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hem hücresel oran hem de yoğun işaretlenme nedeni ile kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın kullanıldığı ZVAD grubunda *MLKL* ifadesinin tedavi grupları olan PRB ve ZP gruplarına göre yüksek olduğu belirlendi. *Pan1* inhibitörü kullanılan PRB grubunda *MLKL* antikoru ile işaretlenen hücre oranının İRK ve ZVAD grubuna göre daha düşük olduğu ve bu işaretlenen hücrelerin az derecede işaretlendiği belirlendi. ZP grubunda *MLKL* antikoru ile işaretlenen hücre oranının İRK ve ZVAD grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi (**Tablo 4.32; Şekil 4.19**).

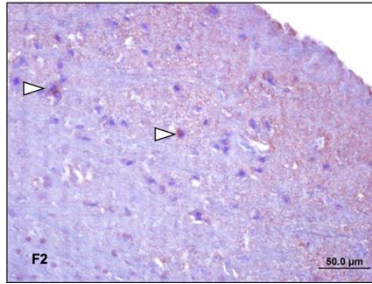
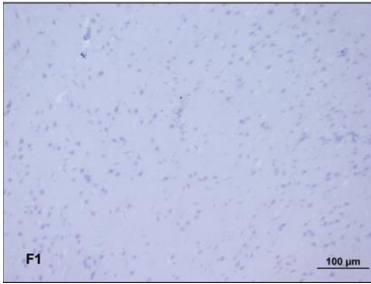
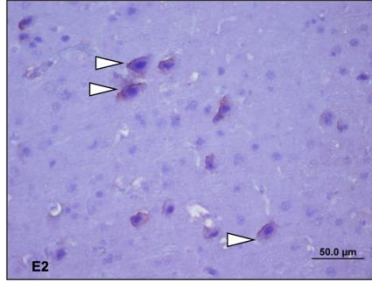
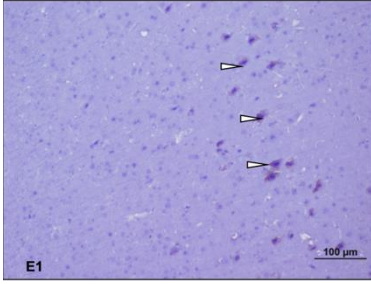
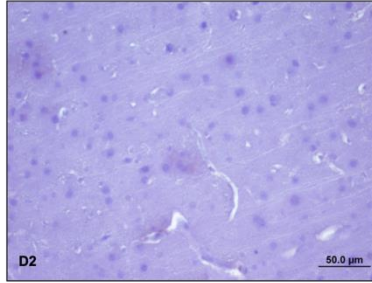
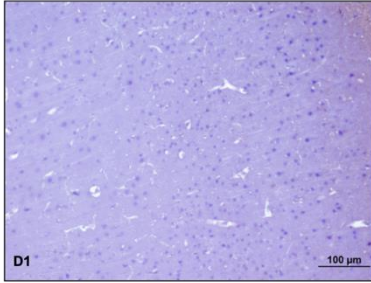
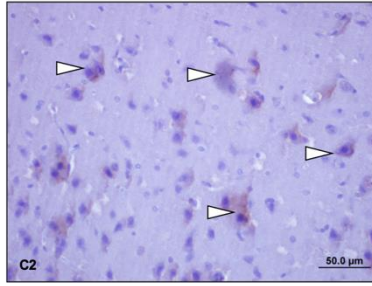
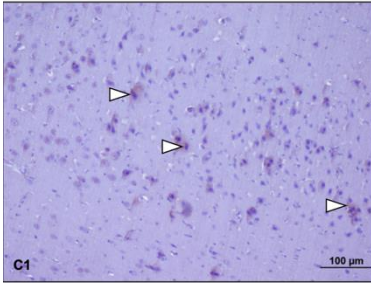
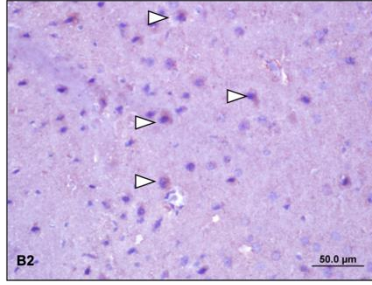
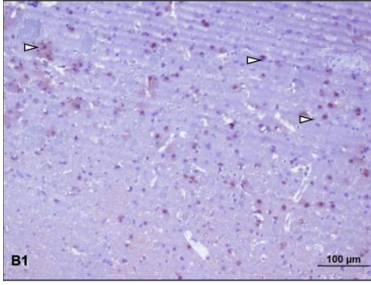
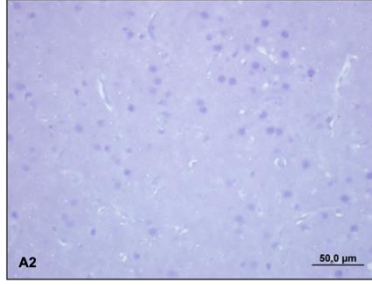
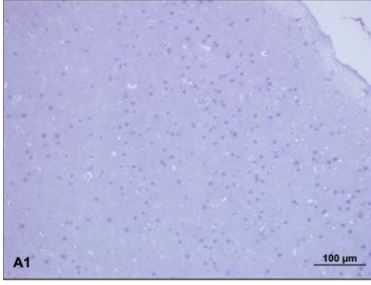
Yapılan değerlendirmeler sonucunda *MLKL* ifadesinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve *Pan1* inhibitörünün kullanıldığı ZP ve PRB gruplarında kontrol grubuna en yakın *MLKL* ifadesine ulaştığı belirlendi.

Tablo 4.32 MLKL antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

GRUP	Karşılaştırma	MLKL				p-değeri
		-	+	++	+++	
K	Grup içi	100	0	0	0	<0.0001*
	Gruplar arası	62.50	0	0	0	
İK	Grup içi	0	30	40	30	
	Gruplar arası	0	18.75	30.77	20	
İRK	Grup içi	0	0	30	70	
	Gruplar arası	0	0	23.08	46.67	
ZVAD	Grup içi	0	10	40	50	
	Gruplar arası	0	6.25	30.77	33.33	
PRB	Grup içi	30	70	0	0	
	Gruplar arası	18.75	43.75	0	0	
ZP	Grup içi	30	50	20	0	
	Gruplar arası	18.75	31.25	15.38	0	

Skorlama -: yok, +: hafif dağılım, ++: orta dağılım ve +++: yoğun dağılım

*: Fisher's Exact Test



Şekil 14.19 MLKL antikoruna ile immünohistokimyasal boyama.

(Bar: 100µm, 50.0µm).

A1-A2: K grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda Anti *MLKL* negatif boyanma dikkat çekmekte.

B1-B2: İK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda Anti *MLKL* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

C1-C2: İRK grubuna ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda Anti *MLKL* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

D1-D2: PRB grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda Anti *MLKL* negatif boyanma dikkat çekmekte.

E1-E2: ZVAD grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda çok sayıda Anti *MLKL* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

F1-F2: ZP grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda birkaç hücrede gözlenen Anti *MLKL* pozitif boyanma (►) dikkat çekmekte.

4.6 TUNEL Bulguları

Beyin dokularında iskemi-reperfüzyon süreci ve bu süreçte apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk, panneksin kanalı inhibitörü probenecid ile bu iki inhibitörün birlikte kullanımının apoptotik hücre ölümüne etkisinin belirlenmesi için yapılan TUNEL çalışmasının değerlendirme sonuçları **Tablo 4.33** ve **Şekil 4.20**'de, deney gruplarında ikili karşılaştırma analizi sonuçları **Tablo 4.34**'de verilmiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda K grubu ile karşılaştırıldığında İK ve İRK grubu apoptoz yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). Ayrıca İK, ZVAD, PRB ve ZP gruplarının apoptoz yüzdelerinin İRK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). ZVAD grubu ile ZP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p = 0.999$), ZP ve ZVAD apoptoz değerinin PRB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi.

Çalışma sonucunda beyin dokusunda kan akımının engellenmesi ile oluşturulan iskemi aşamasında beyin dokusunu oluşturan hücrelerin apoptoz ölüm yolağına girdikleri fakat oluşturulan bu iki saatlik iskemi sonrasında kan akımının yeniden sağlanmasının 24 saatlik sürecinde, bu dokularda daha fazla apoptotik hücre oranının görüldüğü belirlendi. Bununla birlikte yirmi dört saatlik reperfüzyon sürecinde artan apoptoz oranının apoptoz inhibitörü Z-VAD-fmk'nın ve *Pan1* inhibitörü probenecidin ayrı ayrı ve birlikte kullanımı ile azaldığı belirlendi.

Tablo 4.33 Deney gruplarında apoptoz yüzdesi.

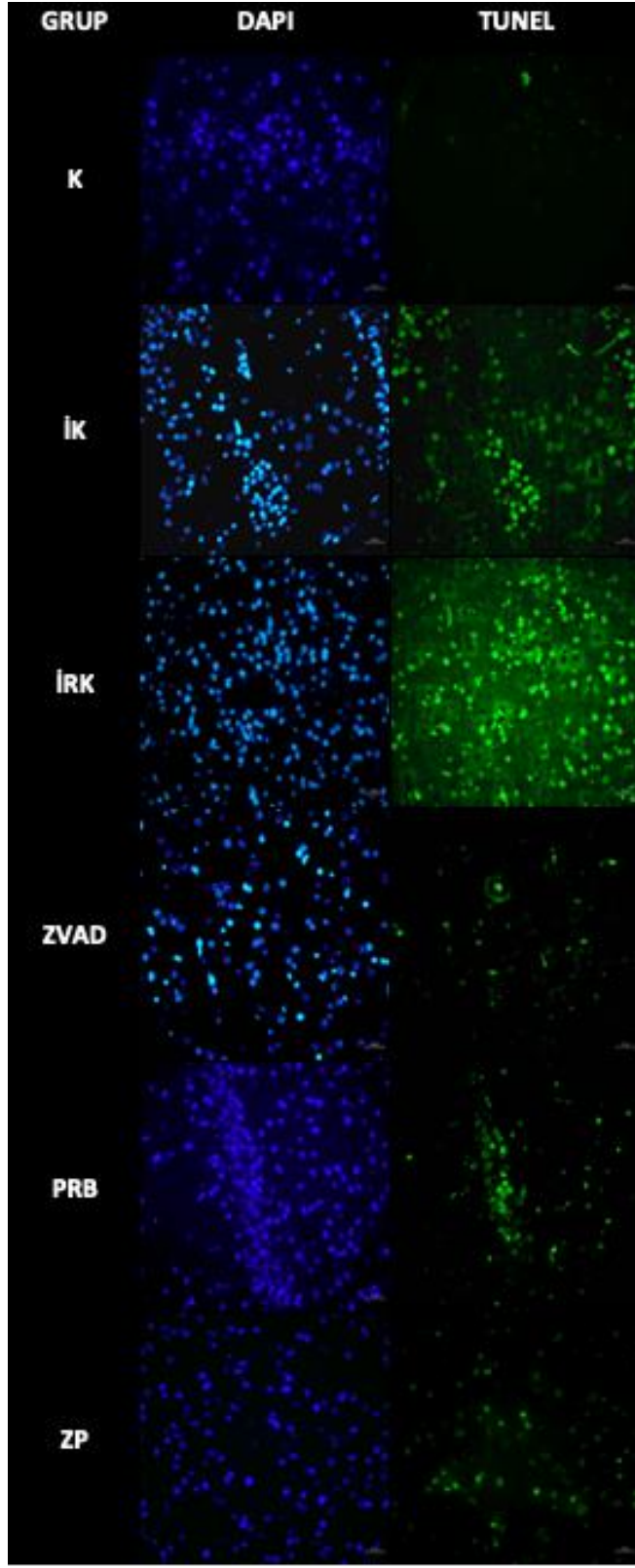
Apoptoz (%)						
K	İK	İRK	ZVAD	PRB	ZP	p
Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	Değeri
5.15 ± 1.91	47.98 ± 5.16	78.46 ± 1.58	16.02 ± 4.51	33.69 ± 4.11	16.91 ± 4.71	<0.001*

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart Sapma

**: Tek Yönlü Varyans Analizi*

Tablo 4.34 Deney gruplarında apoptoz yüzdesinin Tukey yöntemine göre ikili çoklu karşılaştırmaları.

GRUP	p-Değeri
K vs. İK	<0.000
K vs. İRK	<0.000
K vs. ZVAD	0.003
K vs. PRB	<0.000
K vs. ZP	0.001
İK vs. İRK	<0.000
İK vs. ZVAD	<0.000
İK vs. PRB	<0.000
İK vs. ZP	<0.000
İRK vs. ZVAD	<0.000
İRK vs. PRB	<0.000
İRK vs. ZP	<0.000
ZVAD vs. PRB	<0.000
ZVAD vs. ZP	0.999
PRB vs. ZP	<0.000



Şekil4.20 Deney gruplarında TUNEL boyama.

5. TARTIŞMA

Bireylerde ölüme ya da kalıcı hasara sebep olabilen inme, Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı çalışmalarla ölümün ikinci, engelliliğin üçüncü temel nedeni olarak tanımlanan serebrovasküler yapıda bir halk sağlığı sorunudur. İnme olgularının %85'inde görülen arteriyel tıkanma ya da yetersiz perfüzyon sonucunda beyne giden kan akımının azalması veya durması ile oluşan süreç **iskemik inme** olarak sınıflandırılmaktadır (M. Yang et al., 2017). Beyin iskemisi sonucunda bölgesel kan akışının azalması veya durması eksitoksisite, periinfarkt depolarizasyon, inflamasyon, nitrik oksit üretimi, serbest radikal hasarı ve hücre ölümü olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerin tetiklenmesine sebep olur (Ojo et al., 2019; Tan et al., 2019; Yang, Huang, Hu, & Tang, 2019). Tüm bu süreçlerin moleküler düzeyde hücre haberleşmesi, metabolizma ve gen ifadelerinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Amani et al., 2019; S. Q. Liu et al., 2019; MacManus & Linnik, 1997; Nakayama, Nagata, Masuda, Asahara, & Takizawa, 2019). Dolayısıyla bu penumbral doku hasarının azaltılması ve nörolojik hasarın en aza indirgenmesi terapötik hedefler haline gelmiştir (Mir, Al-Baradie, & Alhussainawi, 2014).

Beyin iskemi ve reperfüzyon sürecinde *panneksin* kanallarının açılması oksijen- glikoz yoksunluğu, hücreler arası alanda yüksek K⁺ konsantrasyonu, hipoglisemi, NMDA reseptörlerinin uyarımı gibi çeşitli faktörler tarafından indüklenir. Glikoz ve ATP gibi iyon ve moleküllere karşı geçirgen olan panneksin 1 kanallarının açılması hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilecek hipoksik depolarizasyona neden olur (Thompson, 2015; K. Q. Zhou et al., 2019).

Beyin İ/R hasarı da dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik durumlarda panneksin kanallarının rolünün araştırılması sürecinde özel olarak bu kanalların inhibisyonunun sağlayacak madde arayışına girilmiştir (Bargiotas et al., 2011; Penuela et al., 2013; W. Silverman, Locovei, & Dahl, 2008; W. R. Silverman et al., 2009). Özellikle konneksin ve panneksin kanallarının ayırımını yapabilen özel

inhibitörlerin bulunamaması nedeni ile bu iki kanala ait fonksiyonlar ayırt edilememiştir. Silverman ve ark. ları gut ve guta bağlı arterit hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, hastalığının tedavisi için kullandıkları probenecidin iyi bir panneksin1 kanal inhibitörü olduğunu rapor etmişlerdir (W. Silverman et al., 2008). Yine Silverman ve ark. *Pan1* kanalının nöron ve astrositlerde inflamazom aktivasyonunda etkisini araştırdıkları bir çalışmada, yüksek ekstrasellüler K⁺ tarafından uyarılan inflamazom ve kaspaz 1 aktivasyonunun *Pan1* kanallarının probenecid ile bloke edilmesi ile engellendiğini bildirilmişlerdir (W. R. Silverman et al., 2009).

Beyinde iskemi ve reperfüzyon süreçleri ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolak ve intrinsik (mitokondriyal) olmak üzere iki apoptoz yolağını tetikler. Ekstrinsik yolak hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlatılır ve kaspaz-8'in uyarılmasıyla devam ederken, intrinsik yolak oksidatif stres ve inflamasyon gibi etmenler tarafından başlatılarak sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişi ve kaspaz 9'un aktivasyonu ile devam eder. Hem kaspaz 8 hem de kaspaz 9 efektör kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek, hücrenin apoptoza girmesini sağlar (Broughton et al., 2009; K. Chen et al., 2019). Z-VAD-fmk hücre içerisine rahatça girebilen, düşük dozlarda tüm kaspazları inhibe edebilen ve kaspazların inhibisyonu sürecinde dokuda toksik sorunlara yol açmayan bir inhibitördür (Mehta et al., 2007). Beyin iskemi ve reperfüzyon modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda Z-VAD-fmk kullanılarak kaspazların inhibe edilmesi sonucunda apoptozun kaspaz bağımlı yolaklarının engellendiği ve İ/R hasarında oluşan doku hasarını azalttığı bildirilmiştir (Endres et al., 1998; Hara et al., 1997; Krupinski, Lopez, Marti, & Ferrer, 2000; Morita-Fujimura, Fujimura, Yoshimoto, & Chan, 2001). Yapılan çeşitli çalışmalarda Z-VAD-fmk'nın apoptozu inhibe ederken nekroptozu tetiklediği bildirilmiştir. *Kaspaz 8 RIPK1*'in proteolitik olarak kesimini sağlayarak hücrelerin nekroptozdan kaçmasını sağlar. Yapılan çeşitli çalışmalarda *kaspaz 8* inhibisyonunun hücrelerde *RIPK1* yıkımının engellenmesi ile nekroptoz

yolaklarının aktive olduğu bildirilmiştir (Berghe et al., 2014; Lin, Devin, Rodriguez, & Liu, 1999; Linkermann et al., 2012; Martinet, Schrijvers, Herman, & Meyer, 2006; Vandenabeele, Berghe, & Festjens, 2006).

Biz de bu çalışmamızda sıçanlarda sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak oluşturulan iki saat iskemi ve sonrasında kan akımının sağlandığı 24 saatlik reperfüzyon süreçlerinde pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* protein/kanal inhibitörü probenecid kullanarak, oluşan beyin İ/R hasarında *Pan1* proteinin/ kanalının apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisini araştırdık.

5.1. TTC Boyama ile Belirlenen Beyin Enfarkt Hacim Yüzdesi Bulgularının Değerlendirilmesi

Deneysel olarak oluşturulan çeşitli İ/R modelleri ile yapılan çalışmalarda enfarkt alanların yerlerinin ve kapsamlarının belirlenmesinde TTC boyama yöntemi kullanılmaktadır. TTC boyama ile enfarkt hacminin değerlendirilmesi yapılan çalışmalarda kontrol/sham gruplarında doku hasarlarının oluşmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca oluşturulan çeşitli beyin İ/R modellerinde, kan akımının engellenmesinin oluşan doku hasarının birçok süreçle birlikte dehidrogenaz enzim aktivitesini de etkileyerek bu dokularda TTC ile boyanmanın oluşmadığı gösterilerek iskemik süreçte beyin toplam enfarkt hacmini arttırdığı vurgulanmıştır (Dong, Bao, Yu, & Liu, 2016; Kabra, Thiyagarajan, Kaul, & Sharma, 2004; Tsuruma et al., 2006; Y. Zhou et al., 2017).

İskemiye takip eden reperfüzyon ile serebral kan akışının yeniden başlaması dokularda reperfüzyona bağlı olarak oksijen miktarının artışı, nötrofil göçü, ROT artışı, beyinde ödem gibi çeşitli metabolik reaksiyonlara sebep olarak doku hasarının ilerlemesine yol açar (Christophe & Nicolas, 2006; Huang et al., 2006; Iadecola & Alexander, 2001; Sugawara et al., 2004; Swanson et al., 2004). Ayrıca iyonik ve nörotransmitter dengesindeki değerişimler ikincil doku hasarına neden olur (W. R. Silverman et al., 2009).

Hipoksi ile indüklenen faktör-1α'nın iskemik beyin hasarında gelişen nekroptoz ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanımının İ/R grubuna göre enfarkt hacmi azalttığı gösterilmiştir (M. Yang et al., 2017). *Glukokortikoid modüler element bağlayıcı protein 1'in* başlatıcı prokaspazlara bağlanarak beyin iskemisinin neden olduğu apoptoz ve nöronal hasarı engellediğini gösteren çalışmada, Z-VAD-fmk kullanımının oluşan İ/R hasarını azalttığı belirtilmiştir (H. Li, Colbourne, Sun, Zhao, & Buchan, 2000; Tsuruma et al., 2006). Hara ve ark. larının çeşitli kaspaz inhibitörleri kullanarak hem sıçanlarda hem de farelerde yaptıkları çalışmada Z-VAD-fmk kullanımının yalnızca oluşturulan beyin İ/R modeli sonucunda artan enfarkt hacmi azaltmakla kalmadığı aynı zamanda beyin ödemi ve bozulan nörolojik davranışsal bozuklukları da azalttığı ve beyin dokusunda moleküler seviyede *IL-1β* düzeyini düşürdüğü rapor edilmiştir (Hara et al., 1997). Buna karşılık Dong ve ark. beyin iskemisi ve reperfüzyon hasarı üzerine yaptıkları çalışmada ise iskemisi-reperfüzyon hasarında artan enfarkt hacminin, kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanımı ile daha da arttığını bildirilmişlerdir (Dong et al., 2016).

C57/BL6J fareleri üzerinde orta serebral arter tıkanması modeli ile yapılan bir çalışmada, *Pan1* inhibitörü olan probenecidin intraperitoneal olarak uygulanmasının artan enfarkt hacmi ve nörolojik skoru azalttığı rapor edilmiştir (Xiong et al., 2014).

Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemisi/reperfüzyon hasarında *Pan1* proteininin apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmamızda, İ/R süreçleri ve bu süreçlerde apoptoz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* inhibitörü probenecidin oluşturulan iskemik hasara karşı etkileri TTC boyama ile makroskopik olarak incelenmiştir.

Deney gruplarında sıçanlarda sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak oluşturulan 2 saatlik iskemisi sonucunda beyin dokusunda iskemik hasar olduğu ve bu hasarın iskemiyi takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde daha da arttığı

belirlendi. Çalışmamızda iskeminin 1. saati ile reperfüzyon uygulamasının 5. saatinde intraperitoneal olarak uygulanan Z-VAD-fmk ve probenecidin ayrı ayrı uygulanması, iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan enfarkt hacminin azalmasına neden olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile uyum gösterdi. Çalışmamızda, literatürde herhangi bir bilgiye rastlanılmamasına rağmen hem apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın hem de *Pan1* inhibitörü olan probenecidin birlikte kullandığımızda enfarkt hacminin ve buna bağlı olarak da reperfüzyon hasarının diğer tedavi gruplarına göre daha fazla azaldığı belirlendi. Yaptığımız çalışmalar sonucunda bu iki inhibitörün birlikte kullanılmasının beyin dokusunda oluşan İ/R hasarının geriletmesinde etkili bir yöntem olabileceği belirlenerek literatüre katkı sağlandı.

5.2. RT-PCR ile Belirlenen Gen ifadelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan beyin iskemi/ reperfüzyon hasarında *Pan1* proteininin apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisinin araştırılmasında beyin dokusundaki kaspaz 3, kaspaz 8, RIP1, RIP3 ve MLKL gen ifadeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendi.

5.2.1. Kaspaz 3 gen ifadelerinin değerlendirilmesi

Beyin arterinde tıkanmadan kaynaklı iskemi ve reperfüzyon sürecinde iskemik hasar oluşumu gözlenir. Bu hasar alanında kan akışı azalmış ve fonksiyonları bozulmuş fakat metabolizma faaliyetleri devam eden iskemik penumbra olarak adlandırılan bir alan bulunmaktadır (Hakim, 1987; Heiss, 2000; Schlaug et al., 1999; Shu et al., 2019). Uzun bir süre beyin iskemisinde temel ölüm yolağının nekroz olduğu düşünülmüştür (Ashe & Berry, 2003; Broughton et al., 2009; Herdegen & Delgado-Garcia, 2007; Macdonald & Stoodley, 1998; Unal-Cevik, Kılınç, Can, Gürsoy-Ozdemir, & Dalkara, 2004). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, iskemi sonrası ilk birkaç saatte iskemik penumbra bulunan nöronların geçici olarak geri dönüşlü hasara uğradığını ve hücrelerin ölüm yolağı

olarak apoptoza girdiğini ileri sürmüştür (Broughton et al., 2009; Doyle et al., 2008; Mehta et al., 2007; W. Zhang & Meng, 2019). Kaspaz 3 geni hücrede apoptozun ilerlemesinde merkezi bir rol oynayan bir sistein-aspartik asit proteaz olan *kaspaz 3* proteininin kodlanmasından sorumludur. Çeşitli çalışmalarda beyinde oluşan İ/R sürecinde nöronal apoptozun temel olarak *kaspaz 3* tarafından düzenlendiği belirtilmiştir (Graham & Chen, 2001; Halonen, 2016; Huang et al., 2006; Iadecola & Alexander, 2001; Tan et al., 2019).

Orta serebral arter tıkanması ile oluşturulan bir saatlik iskemi sonrasında farklı periyotlarda reperfüzyona maruz kalmış sıçanlarla apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerindeki değişimlerinin araştırıldığı çalışmalarda, üçüncü reperfüzyon saatinden itibaren hem kortekste hem de hipokampusta kaspaz 3 ifadesinin arttığı ve 48. saatte maksimum düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Harrison et al., 2001; G. Liu, Wang, Wang, Song, & Zhou, 2013). Hem fokal hem de global iskemi modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalar, İ/R hasarında ekstrasellüler alanda K⁺ artışı, inflammatik faktörler, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres, glutamat eksitotoksitesisi ve kalsiyum akışı gibi oluşan çeşitli faktörler nedeni ile *kaspaz 3*'ün aktivitesini arttırdığı ya da bu faktörlerin nöronları apoptoza teşvik ederek kaspaz 3 gen ifadesini arttırdığını göstermektedir (He, Zhang, Lv, Sun, & Chen, 2019; Kam & Ferch, 2000; Namura et al., 1998; W. R. Silverman et al., 2009; Tan et al., 2019; Wen et al., 2019; T. Wu, Yin, Kong, & Peng, 2019; F. Xu et al., 2019; W. Zhang & Meng, 2019; S. Zhu et al., 2019).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatür bilgilerinde de ifade edildiği gibi iki saatlik iskemi ile bunu takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinin kaspaz 3 gen ifadesinin arttığını göstermektedir.

Apoptozun İ/R hasarı sürecine katılımı ve bu süreçte çeşitli kaspazların görev almasının belirlenmesi neticesinde deneysel olarak oluşturulan hem global hem de fokal İ/R modellerinde geniş spektrumlu kaspaz inhibitörlerinin nöroprotektif etkileri araştırılmıştır (Hara et al., 1997; Namura et al., 1998). Pan-kaspaz

inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanımının kaspaz 3 ifadesini azalttığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Endres et al., 1998; Hara et al., 1997). Çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak, sıçanlarda deneysel olarak oluşturduğumuz beyin İ/R modelinde iskeminin 1. ve reperfüzyonun 5. saatinde intraperitoneal olarak uygulanan Z-VAD-fmk'nın İ/R sürecinde artan kaspaz 3 gen ifadesini azalttığını belirlendi.

Yeni doğan sıçanlardan elde edilen hippokampal alanlar ile yapılan bir kültür çalışmasında *Pan1* inhibitörü olan karbenoksolon kullanımının kaspaz 3 ifadesini ve nöronal hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Pina-Benabou et al., 2005). Başka bir çalışmada, *Pan1* 'in karbenoksolon ile inhibisyonunun, ICH'nin neden olduğu beyin iskemi ve reperfüzyon hasarında kaspaz 3 ifadesini önemli ölçüde düşürdüğü ve nöronal apoptozu azalttığı bildirilmiştir (L. Zhou et al., 2018). *Pan1* kanallarının yüksek ekstrasellüler K⁺ ile aktivasyonu sağlayarak astrosit hücre ölümüne neden olduğu ve bu süreçte kaspaz 3'ün rolünün araştırıldığı çalışmada, *Pan1* ifadesinin kaspaz-3 gen ifadesinin tetiklenmesi için hem gerekli hem de yeterli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada astrositlerde *Pan1* kanallarının probenecid ile inhibisyonunun K⁺ kaynaklı *kaspaz-3* aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Jackson, Wang, Keane, Scemes, & Dahl, 2014). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ile uyumlu olup bizim iskeminin birinci saatinde ve reperfüzyonun 5. saatinde *Pan1* inhibitörü olan probenecid uygulamamız İ/R sürecinde artan kaspaz 3 gen ifadesini azaltmıştır.

Yapılan literatür taramaları sonucunda beyin iskemi reperfüzyonunda hem probenecid hem de Z-VAD-fmk'nın birlikte kullanıldığı bir çalışmaya ulaşamadık. Beyin iskemi ve reperfüzyon hasarında hem pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk hem de *Pan1* reseptörü probenecidin birlikte kullanımının artan kaspaz 3 gen ifadesini azalttığı ve bu sonucun Z-VAD-fmk'nın tek başına kullanılması ile elde edilen aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

5.2.2. Kaspaz 8 gen ifadesinin değerlendirilmesi

Yapılan çeşitli çalışmalar beyin iskemisi sonrasında penumbra hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yolağının aktive olabileceğini göstermektedir. İskemi başlangıcı ile oksijen, glikoz ve çeşitli substratların dokuya erişiminin sınırlandırılması, nöronal iyon gradyanlarının bozulması, enerji eksikliği ile birlikte zar potansiyeli bozulması ve kalsiyum kanallarının aktifleşmesi gibi faktörler hücre içerisinde kalsiyumun sitotoksik birikimini sağlayarak intrinsik apoptozu başlatır. Ekstrinsik yolak ise hücre zarı reseptörü olan *FAS* veya *TNF* reseptörleri ile ilişkili ligandların bağlanması ile başlatılır. *FADD* proteini olan bir adaptör molekülü *prokaspaz 8*'i aktive eder. Aktif hale gelen *kaspaz 8* *prokaspaz 3*'ü aktive ederek hücreyi ölüme götürür. *Kaspaz 8* ayrıca *Bcl-2* ailesi proteinlerinden *Bid*'i aktive ederek apoptozun mitokondriyal yolunu başlatabilir (Broughton et al., 2009; Graham & Chen, 2001; Güneş, 2014; Sugawara et al., 2004). *Kaspaz 8* yalnızca apoptoz ile ilişkili bir protein olmayıp farklı süreçlerde de rol oynamaktadır. Özellikle belirli koşullar altında hücrenin hangi sürece gireceğini belirleyebilme özelliğine sahiptir. Uyaran çeşidi ve etkileşim yapısına bağlı olarak *kaspaz 8* hücrelerde nekroptozu baskılayarak hücrelerin apoptoza girişini sağlayabilir ya da NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunu sağlayarak hücrenin hayatta kalması için gerekli faktörlerin aktivasyonunda rol alabilir (Kataoka & Tschopp, 2004; Oberst & Green, 2011; Salvesen & Walsh, 2014; X. Shen, Venero, Joseph, & Burguillos, 2018). Ayrıca *kaspaz 8* nekroptoz için düzenleyici bir role sahip olup, inhibisyonu ile nekroptozu tetikler (X. Shen et al., 2018).

Harrison ve ark.larının sıçanlarda oluşturdukları fokal serebral iskemi modeli üzerinde tüm kaspazların ifadelerini belirledikleri çalışma *kaspaz 8* mRNA ifadesinin arttığını göstermektedir (Harrison et al., 2001). Başka bir çalışmada hem *Fas*'a bağımlı hem de *sitokrom c*'ye bağlı apoptotik yolaklarda önemli bir rol oynayan *kaspaz 8* gen ifadesinin geçici fokal iskemi modelinde arttığı belirlenmiştir (Morita-Fujimura et al., 2001). Krupinski ve ark. larının yaptığı bir

çalışmada, *kaspaz 8* immünoreaktivitesinin fokal serebral iskemi sürecinde artmaya başladığı ve bu artışın hem enfarktli dokuda hem de penumbra 24 saate kadar devam ettiği bildirilmektedir. Aynı çalışmada kaspaz inhibitörlerinin kullanılmasının iskemi sürecinde artan kaspaz 8'in gen ifadesini azalttığı belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda kaspaz inhibitörlerinin iskemi tedavisi için ilave terapötik ajan olma potansiyele sahip olduğu ve bu konu üzerinde daha fazla araştırma yapılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır (Krupinski et al., 2000).

Çalışmamızda literatür bilgilerine uygun olarak iki saatlik iskemi sürecinde kaspaz 8 gen ifadesinin artmaya başladığı ve bu süreci takip eden 24 saatlik reperfüzyonda gen ifadesinin artmaya devam ettiği, iskemi ve reperfüzyon süreçlerinde intraperitoneal olarak Z-VAD-fmk uygulamasının artan kaspaz 8 gen ifadesini azalttığı belirlendi.

Yapılan literatür çalışmalarında, iskemik süreçler nedeni ile ekstrinsik apoptozda aktifleşen kaspaz 8'in *Pan1* protein kanallarını aktive ederek açılmasına neden olduğu bildirilmiştir (Aguirre, Shoji, Sáez, Henríquez, & Quest, 2013; K. Chen et al., 2019). Fakat probenecidin kaspaz 8 gen ifadesi üzerindeki etkisi ile ilişkili bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Çalışmamızda probenecidin tek başına uygulanması İ/R hasarında artan kaspaz 8 gen ifadesini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca çalışmamız sonucunda Z-VAD-fmk uygulaması ile her iki inhibitörün birlikte uygulanmasının İ/R nedeni ile artan kaspaz 8 gen ifadesini azaltmada aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

5.2.3. RIP1 gen ifadesinin değerlendirilmesi

Nekroptoz, iskemi dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilen programlanmış bir hücre ölüm sürecidir. *RIPK1*, *RIPK3* ve *MLKL* nekroptozda rol oynayan ana moleküllerdir. *TNF-α* tarafından uyarılan hücrelerde *RIPK1*'in aktivasyonu, nekroptoz veya apoptoz yoluyla düzenlenmiş hücre ölümlerinin teşvik edilmesinde önemli bir rol oynar. Aktive

edilmiş *RIPK1*, apoptoza aracılık etmek üzere kompleks IIa oluşturmak için *FADD* ve *kaspaz 8* ile etkileşime girerken nekroptozun oluşması için gerekli olan kompleks IIb oluşumu için *RIPK3* ile etkileşime girer. Hücrelerin bu süreçlerden hangisine gireceği esas olarak *kaspaz 8* ve *cIAP1*, *cIAP2*, *XIAP* gibi apoptoz inhibitör proteinlerine bağlıdır. Apoptoz inhibitör proteinleri *RIPK1*'in ubiquitinasyonuna neden olurken *kaspaz 8* proteinin aktivasyonu *RIPK1*'in proteolitik olarak kesimine aracılık eder. *Kaspaz 8* aktivitesinin inhibisyonu *RIPK1* kesimini engelleyerek nekroptozu tetikler (Choi, Price, Ryter, & Choi, 2019; Grootjans, Berghe, & Vandenabeele, 2017; X. Li et al., 2019; Y. Liu et al., 2019; Shan, Pan, Najafov, & Yuan, 2018; Yuan, Amin, & Ofengeim, 2019; Zhu, Zhang, Yang, & He, 2019).

Yapılan çeşitli çalışmalarda beyinde iskemik hasar sonucunda hücrelerde hem apoptotik hem de nekroptoz hücre ölüm yollarının aktive olduğu bildirilmiştir (Degterev et al., 2005; Deng, Li, & Sun, 2019; Fakharnia, Khodagholi, Dargahi, & Ahmadiani, 2017; Galluzzi et al., 2018; Hribljan, Lisjak, Petrović, & Mitrečić, 2019; H. Shen et al., 2017; Yin et al., 2015; W. Zhou & Yuan, 2014; Y. Zhou et al., 2017). Vieira ve ark. larının *in vitro* olarak hippokampal nöronlar üzerinde oksijen-glikoz mahrumiyeti (OGD) modeli ile oluşturdukları global iskemide nekroptoz yolağını incelemişler ve model oluşumundan 24 saat sonra RIP1 gen ifadesinin arttığını belirlemişlerdir (Vieira et al., 2014). β -karyofilenin nekroptoz ve inflamasyon üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, beyin dokusunda RIP1, RIP3 ve MLKL mRNA düzeylerinin fokal iskemiden 48 saat sonra belirgin bir şekilde artmış olduğu bildirilmiştir (M. Yang et al., 2017). Deneysel intraserebral kanama modeli oluşturularak RIP1'in nekroptozdaki rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada, sham grubu ile yapılan karşılaştırma sonucunda RIP1 ifadesinin 24 saatte aşamalı olarak artarak en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir (H. Shen et al., 2017).

Kaspaz 8 proteini *RIPK1*'in proteolitik olarak kesimini sağlayarak hücrelerin nekroptozdan kaçmasını sağlar. Yapılan çeşitli çalışmalarda *kaspaz 8* inhibisyonunun hücrelerde *RIPK1* yıkımının engellenmesi ile nekroptoz yollarının aktive olduğu bildirilmiştir (Berghe et al., 2014; Lin et al., 1999; Linkermann et al., 2012; Martinet et al., 2006; Vandenabeele et al., 2006). Primer kortikal nöronlarda OGD reperfüzyon modeli ile oluşturulan İ/R hasarında geldanamisinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Z-VAD-fmk kullanımının RIP1 gen ifadesini artırdığı gösterilmiştir (W. W. Chen et al., 2012). Nekroptozun OGD modeli ile *in vitro* olarak incelenmesi sonucunda Z-VAD-fmk kullanımının RIP1, RIP3 gen ifadelerini artırdığı ve bu artışın *RIP1-RIP3-MLKL* etkileşimlerini düzenlediği bildirilmiştir (Qu et al., 2016).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular literatür bilgilerinde de ifade edildiği gibi iskemi ve reperfüzyon sonucunda beyin dokusunda RIP1 gen ifadesinin arttığı yönündedir. Ayrıca çalışmamızda apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak kullanımının İ/R sonucunda artan *kaspaz 8* gen ifadesini azaltarak RIP1 gen ifadesinin daha fazla yükselmesine neden olduğu ve hücrelerin nekroptozda daha duyarlı hale geldiği kanaatine varıldı.

Beyin İ/R sürecinde mikrogliaların ve astrositlerin aktivasyonu nöroinflamasyonu uyarır ve bu süreçte diğer hücrelerde ikincil İ/R hasarına neden olarak nöronal ölümü şiddetlendirir. Yapılan çeşitli çalışmalarda apoptotik hücrelerin bir enflamatuvar reaksiyon ortaya çıkarmadan fagositoz ile hızlı bir şekilde ortamdaki uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Fakat nekroptotik hücreler, hücre içi içeriklerinin salınımını engelleyemezler. Özellikle nekroptozda *MLKL* proteininin aktivasyonu hücre zarı geçirgenliğinin artmasına ve *Pan1* kanallarının aktivasyonuna sebep olarak çeşitli proenflamatuvar moleküllerin ve DAMP'ların nekroptotik hücrelerden salınımını artırır (Heckmann, Tummers, & Green, 2019). *Pan1* kanalları beyin İ/R sürecinde NMDAR'lar tarafından aktive edilerek kontrolsüz glutamat salınımına ve lezyon bölgesinde Ca^{+2} 'nin aşırı artmasına

neden olarak eksitotoksisite oluşumunu destekler. Aktif *Pan1* kanalları DAMP'ların / PAMP'ların hücre içine girmesini sağlayarak, hücre içi TLR'lerin aktive olmasını sağlayabilir. Bu nedenlerden dolayı *Pan1* kanalları inflamasyon başlatıcı hem de ikincil hücre ölümü ile ilişkili yollar için düzenleyici olarak tanımlanmaktadır (Kim et al., 2017; S. Li et al., 2018; Maes et al., 2013; Penuela et al., 2013). Wei ve ark. ları sıçanlarda oluşturdukları beyin İ/R hasarı çalışmalarında, *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecidin lizozomal ve enflamatuvar hasarı azalttığını bildirmişlerdir (R. Wei et al., 2015). Farelerde karragenanın intraventriküler olarak uygulanması ile oluşturulan beyin inflamasyon modeli ile yapılan bir çalışmada probenecid uygulamasının oluşan beyin iltihabını tamamen inhibe etti belirlenmiştir (Gamache & Ellis, 1986). *Pan1* kanallarından hücre içine giren DAMP'lar nekroptozu tetikleyebilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda nekroptozun yalnızca ölüm reseptörlerinin ligandları ile değil aynı zamanda toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve interferon (IFN) reseptörleri ligandları tarafından da başlatılabileceği bildirilmiştir (Shestopalov & Slepak, 2014).

Çalışmamızda *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımının RIP1 gen ifadesinin azalmasına neden olduğu gözlemlendi. Yapılan literatür taraması sonucunda *Pan1* kanallarının RIP1 gen ifadesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya ulaşamadık. Çalışmamızda probenecid kullanımı sonucunda *Pan1* kanallarının kapatılması, dokunun ikincil hasara maruz kalmasını TLR artışını engellemiş, böylece nekroptozu engelleyerek RIP1 gen ifadesini azaltmış olabilir.

Çalışmamızda Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılması İ/R sürecinde artan RIP1 gen ifadesini önemli ölçüde azalttığı belirlendi. Her iki inhibitörün birlikte kullanımı ile probenecidin tek başına uygulaması arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı. Yapılan literatür araştırmalarında iki inhibitörün birlikte

kullanılmasının RIP1 gen ifadesi üzerine etkileri ile ilişkili çalışmalara ulaşamamıştır.

5.2.4. RIP3 gen ifadesi bulgularının değerlendirilmesi

RIP3, *MLKL* aktivasyonunu sağlayarak metabolizmada ve hücre zarında değişimlere sebep olarak nekroptozun alt yolağını düzenler (Nikseresht et al., 2019). Yapılan bir çalışmada *RIPK1*'den bağımsız olarak *RIPK3* aracılı nekroptozun oluşabileceği bildirilmiştir. Hem *kaspaz 8* hem de *RIPK1* düzeylerinin çok düşük olduğu durumlarda *kaspaz 8*'in negatif düzenlemesi sonucunda *RIPK3*'ün nekroptozun oluşumu için yeterli olduğu belirtilmiştir (Vanlangenakker et al., 2011). *RIPK3*, *TLR*'lerin uyarılması sonucunda adaptör-indükleyici *IFN- γ* (*TRIF*) ve DNA sensörü *ZBP1/DAI* ile etkileşime girerek aktive edilir. Aktive edilmiş *RIPK3*'de *MLKL*'yi aktive eder (Kaiser et al., 2013; Upton, Kaiser, & Mocarski, 2012).

Yang ve ark. ları fokal iskemiden 48 saat sonra RIP1, RIP3 ve MLKL mRNA düzeyleri belirgin şekilde arttığını tespit etmişlerdir (M. Yang et al., 2017). OSA tıkaaması ile oluşturulan iskemi sonrası 6, 12 ve 24 saat olmak üzere farklı reperfüzyon süreçlerine maruz bırakılan sıçan beyinleri üzerinde yapılan bir çalışmada, RIP3 ve MLKL gen ifadelerinin reperfüzyon sonrası 24 saate kadar arttığı gösterilmiştir (Nikseresht et al., 2019). Vieira ve ark. yaptıkları bir çalışmada, iskemik hasarın RIP3 gen ifadesini arttırarak nöronlarda nekroptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir. OGD'yi takip eden RIP3 mRNA düzeylerindeki artış, protein düzeyindeki artışa sebep olarak 24 saat sonra RIP3 protein düzeyinin kontrol grubuna göre 1.5 kat daha fazla artmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada, global beyin iskemisi modelinde de RIP3 gen ifadesinin arttığı, *in vivo*, gösterilmiştir. (Vieira et al., 2014). Kanno ve ark. farelerde omurilik yaralanması sonrasında oluşan nöronal doku hasarı ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, RIP3 gen ifadesinin yaralı omurilikteki çeşitli

nöronal hücrelerde arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada RIP3 ifadesindeki artışın hasar oluşumundan üç gün sonra da devam ettiğini belirterek, bu artışın sebebinin ikincil nöronal doku hasarından kaynaklı olduğunu öne sürmüşlerdir (Kanno, Ozawa, Tateda, Yahata, & Itoi, 2015).

Beyin iskemi ve reperfüzyon hasarının *tümör nekroz faktör α reseptörü1 (TNFR1)* ve *RIPK3* aktivasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, reperfüzyon sürecinde protein ifadesi artan *RIPK 3* aktivitesinin apoptoz inhibitörü Z-VAD-fmk kullanımı sonucunda daha da yükseldiği ve böylece *RIPK3* aracılı nekroptozun kaspazların inhibe edilmesi ile artırıldığı belirlenmiştir (Dong et al., 2016). Nekroptozun hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar ile incelendiği bir makalede, OGD modelinde Z-VAD-fmk kullanımının RIP1, RIP3 gen ifadelerini artırdığı ve bu artışın *RIP1-RIP3-MLKL* etkileşimlerini düzenlediği bildirilmiştir (Qu et al., 2016).

Çalışmamızda hem iki saatlik oluşturulan iskemi hem de bu iskemiye takip eden 24 saatlik reperfüzyon süreçlerinde RIP3 gen ifadesinin arttığı, apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak kullanımının İ/R sonucunda artan RIP3 gen ifadesini daha fazla arttırdığı belirlendi.

Yapılan çeşitli çalışmalarda *Pan1* kanallarının nörotoksisite ile ilişkisi gösterilmiş olmak ile birlikte (Bargiotas et al., 2011; Dvorianchikova et al., 2012; Makarenkova et al., 2018), günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Pan1* kanalları ve RIP3 arasında bir bağlantı rapor edilmemiştir. Çalışmamızda iki saatlik iskeminin 1. saati ile 24 saatlik reperfüzyon sürecinin 5. saatinde intraperitoneal olarak uygulanan *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecid, İ/R sürecinde artan RIP3 gen ifadesini azalttı. Ayrıca çalışmamızda Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanımının RIP3 gen ifadesini en etkili şekilde azaltan yöntem olduğu belirlendi.

5.2.5. *MLKL* gen ifadesi bulgularının değerlendirilmesi

MLKL oligomerlerinin, *TNF- α* ve pan kaspaz inhibitörü uygulaması ile oluşturulan nekroptozda, fosfatidilserin asimetrisini bozarak, zarda *Pan1* kanallarını aktive ettiği tespit edilmiştir (Douanne et al., 2019). Bu çalışma, nekroptoz sırasında, *Pan1* kanallarının küçük ekstrasellüler veziküllerin (EV) salınımına neden olmak için *MLKL* tarafından etkilendiği belirlenmiştir.

Travmatik beyin hasarı modeli ile yapılan bir çalışmada RIP1, RIP3 ve *MLKL* gen ifadesi ve protein düzeylerinin kontrol ve sham gruplarına göre arttığı belirlenmiştir (Z.-M. Liu et al., 2018). Geçici fokal beyin iskemi oluşturulan sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, RIP1, RIP3 ve *MLKL* mRNA düzeylerinin fokal iskemiden 48 saat sonra belirgin bir şekilde artmış olduğu tespit edilmiştir. (M. Yang et al., 2017). OSA tıkaması ile oluşturulan iskemi sonrası farklı reperfüzyon sürelerine maruz bırakılan sıçan beyinleri üzerinde yapılan bir çalışmada, RIP3 ve *MLKL* gen ifadelerinin reperfüzyon sonrası 24 saate kadar arttığı belirlenmiştir (Nikseresht et al., 2019).

Çalışmamızda da literatür bilgileri ile uyumlu olarak, iki saatlik iskemi ve bu iskemiye takip eden yirmi dört saatlik reperfüzyon süreçlerinin *MLKL* gen ifadesini arttırdığı belirlendi.

Nekroptozun hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak incelendiği bir çalışmada, Z-VAD-fmk kullanımının RIP1, RIP3 gen ifadelerini artarken *MLKL* gen ifadesinde anlamlı bir artış belirlenmediği bildirilmiştir (Qu et al., 2016).

Bu çalışma ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da Z-VAD-fmk uygulamasının *MLKL* gen ifadesini önemli düzeyde etkilemediği belirlendi.

Çalışmamızda *Pan1* kanal proteinlerinin nekroptoz üzerindeki etkileri araştırılması amaçlanmış olup bu nedenden dolayı *Pan1* inhibisyonunun *MLKL* gen ifadesine etkisi araştırılmıştır. Bu konu ile ilişkili bir literatüre ulaşamamıştır. Çalışmamız sonucunda *Pan1* kanallarının, probenecid ile inhibe

edilmesi sonucunda İ/R hasarında artan MLKL gen ifadesinin azaldığı belirlendi. Ayrıca, probenecidin tek başına kullanımının Z-VAD-fmk ile birlikte kullanımı ile karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen iki inhibitörün birlikte uygulanmasının İ/R hasarında artan MLKL gen ifadesini daha fazla azalttığı belirlenmiştir.

5.3. Beyin Dokularında Protein Düzeylerinin Değerlendirilmesi

5.3.1. Kaspaz 3 protein düzeyinin değerlendirilmesi

Beyinde oluşan iskemik dokuda eksitoksisite, periinfarkt depolarizasyon, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, enflamatuvar mediyatörlerde artış, ekstrasellüler alanda K⁺ konsantrasyonunun artması, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres, glutamat eksitotoksitesisi, DNA hasarı ve kalsiyum akışı gibi oluşan çeşitli faktörler nedeni ile hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yolları aktive olur. *Kaspaz 3* *kaspaz 9* ve *kaspaz 8* ile aktive edilen efektör kaspazdır (Graham & Chen, 2001; Halonen, 2016; Huang et al., 2006; Iadecola & Alexander, 2001; Tan et al., 2019).

Farklı beyin iskemi modelleri kullanılarak oluşturulan deneysel çalışmalarda, İ/R hasarının kanda ve beyin dokusunda *kaspaz 3* protein düzeyini attırdığı bildirilmektedir (He et al., 2019; Kam & Ferch, 2000; Kamisli et al., 2019; Namura et al., 1998; W. R. Silverman et al., 2009; Tan et al., 2019; Wen et al., 2019; T. Wu et al., 2019; Y.-L. Xie, Zhang, & Jing, 2018; F. Xu et al., 2019; W. Zhang & Meng, 2019; Z. Zhang et al., 2019; S. Zhu et al., 2019).

Çalışmamızda literatür bilgileri ile uyumlu olarak İ/R hasarına bağlı olarak *kaspaz 3* protein düzeyinin arttığı belirlendi. Ayrıca iki saatlik iskeminin oluşturmuş olduğu hasarın incelenmesi sonucunda *kaspaz 3* protein düzeyinin 24 saat reperfüze edilmiş dokudaki *kaspaz 3* düzeyine göre daha düşük olduğu belirlendi. Bu farkın sebebinin iskemi sonrasında kan akışının normale dönmesi

ile ortamda oluşan nötrofil göçü ve ROT artışı gibi çeşitli faktörler tarafından doku hasarının artması ve apoptoz yolaklarının aktive edilmesi olduğu kanaati oluştu.

Deneysel olarak oluşturulan hem global hem de fokal İ/R modellerinde geniş spektrumlu kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda Z-VAD-fmk kullanımının kaspaz 3 ifadesi ve buna bağlı olarak da protein düzeyini azalttığı bildirilmiştir (J. Chen et al., 1998; Endres et al., 1998; Hara et al., 1997; Namura et al., 1998).

Çalışmamızda iskeminin 1. ve reperfüzyonun 5. saatinde uyguladığımız Z-VAD-fmk'nın İ/R sonrasında beyin dokusunda artan *kaspaz 3* protein düzeyini azalttığı belirlendi.

Sepsis ile ilişkili ensefalopati (SAE) modeli ile yapılan bir çalışmada, sepsisin indüklenmesinde itibaren ilk on iki saat içerisinde hippokampal alanda *Pan1* 'in protein düzeyinin artmaya başladığı ve bu durumun yirmi dört saat içerisinde *kaspaz 3* ve *sitokrom c* düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (Z. Zhang et al., 2019). Perinatal global iskemi ile ilgili yapılan bir çalışmada *Pan1* inhibitörü olan karbenoksolon kullanımının kaspaz 3 ifadesini ve protein aktivitesini azalttığı belirtilmiştir (Pina-Benabou et al., 2005). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda *Pan1* kanallarının hem karbenoksolon hem de probenecid ile inhibisyonunun, çeşitli modellerle oluşturulan İ/R hasarında *kaspaz 3* protein düzeyini azalttığı bildirilmektedir (Jackson et al., 2014; L. Zhou et al., 2018).

Bizim oluşturduğumuz İ/R modelinde, literatür ile uyumlu olarak, iskeminin birinci saatinde ve reperfüzyonun 5. saatinde *Pan1* inhibitörü olan probenecid uygulaması İ/R hasarı sonucunda artan *kaspaz 3* protein düzeyini azaltmıştır.

Yapılan literatür taramaları sonucunda beyin iskemi reperfüzyonunda hem probenecid hem de Z-VAD-fmk'nın birlikte kullanıldığı bir çalışmaya ulaşamadık. Çalışmamızda iki inhibitörün birlikte kullanımının inhibitörlerin Z-VAD-fmk'nın tek başına uygulanışı ile aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

Kaspaz 3 protein düzeyi ile ilgili elde edilen sonuçlarımız *kaspaz 3* gen ifadesi sonuçlarımızla uyum gösterdiği belirlendi.

5.3.2. *Kaspaz 8* protein düzeyinin değerlendirilmesi

Kaspaz 8 hücrelerde farklı rollere sahiptir. *Kaspaz 8* proteinin ortamda bulunması nekroptozu baskılayarak hücrelerin apoptoza girişini sağlayabilir ya da *NF-κB* sinyal yolağının aktivasyonunu sağlayarak hücrenin hayatta kalması için gerekli faktörlerin aktivasyonunda rol alabilir (Kataoka & Tschopp, 2004; Oberst & Green, 2011; Salvesen & Walsh, 2014; X. Shen et al., 2018). Ayrıca *kaspaz 8* nekroptoz için düzenleyici bir role sahip olup, inhibisyonu ile nekroptozu tetikler (X. Shen et al., 2018)

Rodhe ve ark. larının hem deneysel olarak farelerde uyguladıkları OSA tıkanması modeli ile oluşturdukları İ/R hasarı dokuları ile yaptıkları çalışmalar hem de inme geçirmiş insanlardan elde ettikleri beyin dokuları ile yaptıkları çalışmalar iskemi sonrasında belirgin bir enflamatuvar yanıtın geliştiğini ve bunun hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir. Bu çalışmada iskemik inme hastalarından elde edilen post-mortem dokularda *kaspaz 8* ve *kaspaz 3* protein düzeyinin arttığı *in vivo* olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde farelerde uygulanan iskemi sonucunda, iskemik periferik alanında *kaspaz 8* ve *kaspaz 3* protein düzeylerinin arttığı da aynı çalışmada ifade edilmektedir (Rodhe et al., 2016). *Kaspaz 6* ve *kaspaz 8* genlerinin retinal iskemi ve fokal beyin iskemisi üzerinde etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki iskemi modeli sonrasında dokularda *kaspaz 6* ve *kaspaz 8* protein düzeylerinde artış belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada *kaspaz* inhibitörlerinin kullanımının iskemik hasar sonucunda artan protein düzeylerinde azalmaya neden olarak serebral ve retinal enfarktüsün nöropatolojik sonuçlarını hafiflettiği belirtilmektedir (Shabanzadeh, D'onofrio, Monnier, & Koeberle, 2015). Deneysel olarak oluşturulan farklı beyin İ/R modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda *kaspaz 8* protein düzeyinin iskemi ile birlikte artmaya başladığı ve Z-VAD-fmk uygulamasının *kaspaz 8* protein düzeyini azalttığı

bildirilmiştir (Krupinski et al., 2000; Lietzau et al., 2009; X. Shen et al., 2018; Velier et al., 1999).

Çalışmamızda hem iki saatlik iskemik süreç ve hem de 24 saatlik reperfüzyon süreçlerinde *kaspaz 8* protein düzeyinin arttığı belirlendi. Apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk uygulamasının, literatür bilgilerinde de ifade edildiği gibi, artan *kaspaz 8* protein düzeyini azalttığı belirlendi.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada *kaspaz 8*'in ekstrinsik apoptoz sırasında *Pan1* kanallarını aktive ederek *NLRP3* inflamazom yolağının aktivasyonunda rol aldığını ileri sürmektedir (Lee & Kang, 2019). Fakat *Pan1* kanallarının *kaspaz 8* protein düzeyi ile ilişkili bir literatüre ulaşılamamıştır. Çalışmamızda *Pan1* inhibitörü olan probenecid uygulamasının iskemi reperfüzyonda artan *kaspaz 8* protein düzeyini azalttığı, bunun yanında Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılmasının *kaspaz 8* protein düzeyini daha da fazla düşürdüğü belirlendi.

5.3.3. RIPK1 protein düzeyinin değerlendirilmesi

RIPK1 hücrelerin maruz kaldığı çeşitli stres faktörlerine bağlı olarak hücreleri ölüm ya da yaşam yollarına yönlendiren bir proteindir. *RIPK1*, karar aşamasında, hücre tipine bağlı olarak, *NF-κB*, MAPK, apoptoz veya nekroptozun aktivasyonunu sağlar. Aktive edilmiş *RIPK1*, hücre ölümü için apoptoza aracılık etmek üzere *FADD* ve *kaspaz 8* ile etkileşime girerek *RIPK1* bağımlı apoptozu tetikler. Buna karşılıklı nekroptozun oluşması için *RIPK3* ile etkileşime girer (Choi et al., 2019; Festjens, Berghe, Cornelis, & Vandenabeele, 2007; Grootjans et al., 2017; X. Li et al., 2019; Y. Liu et al., 2019; Shan et al., 2018; Yuan et al., 2019; F. Zhu et al., 2019).

OGD ile oluşturulan iskemide nekroptoz yolağının incelenmesinde, model oluşumundan 24 sonra *RIPK1* protein düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Vieira et al., 2014). Ni ve ark. larının sıçanlarda OSA tıkanması yöntemi ile *in vivo* hem de

OGD yöntemi *in vitro* olarak oluşturdukları İ/R çalışmalarında, reperfüzyon hasarının iskemik korteks, nöronlar ve astrositlerde *RIPK1*, *RIPK3* protein düzeylerini arttırdığını ve bu artışın *RIPK1-RIPK3* kompleksinin oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir (Ni et al., 2018). Protein ifadesinin belirlendiği çalışmada, intraserebral kanama sonrasında beyin dokularındaki *RIPK1*, *RIPK3*, *MLKL* ve *kaspaz 8* protein ifadesinin arttığı gözlenmiştir (H. Shen et al., 2017). Deng ve ark. larının sıçanlarda tek taraflı geçici fokal beyin iskemi modeli ile yaptıkları bir çalışmada, 24 saatlik reperfüzyon süreci sonrasında inceledikleri beyin dokularında iskemik alandaki *RIPK1*'in protein ifadesinin sham grubu dokularına ve aynı örneklerin kontralateral alanlarına kıyasla anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir (Deng et al., 2019). Ligustroflavonun iskemik inmeden sonra sıçan beynindeki nekroptoz üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, iki saatlik orta serebral arter tıkanması ile oluşturulan iskemi ve yirmi dört saatlik reperfüzyon uygulanan sıçanlarda *RIPK1*, *RIPK3* ve *MLKL/p-MLKL* protein düzeylerinin sham grubuna göre arttığı belirlenmiştir (Y.-Y. Zhang et al., 2019).

Çalışmamızda oluşturduğumuz İ/R modelinde literatür bilgilerine uygun olarak, iskemi ve İ/R süreçlerinin *RIPK1* protein düzeyini arttığı belirlendi.

RIPK1'in nekroptozu başlatabilmesi için proteolitik kesiminin engellenmesi gerekmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda *kaspaz 8* inhibisyonunun hücrelerde *RIPK1* yıkımının engellenmesi ile nekroptoz yolaklarının aktive olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bir pan kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın İ/R sürecinde kullanılmasının *kaspaz 8*'i inhibe ederek RIP1 gen ifadesini ve protein düzeyini arttırarak nekroptozu tetiklediği gösterilmiştir (Berghe et al., 2014; W. W. Chen et al., 2012; Lin et al., 1999; Linkermann et al., 2012; Martinet et al., 2006; Qu et al., 2016; Vandenabeele et al., 2006).

Çalışmamızda iskeminin birinci saatinde ve reperfüzyonun 5. saatinde Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak uygulanmasının, İ/R sürecinde artan *RIPK1* protein düzeyinin *kaspaz 8*'in inhibe edilmesi ile daha fazla arttırdığı belirlendi.

Çalışmamızda *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımının beyin İ/R sürecinde artan *RIPK1* protein düzeyinin azalmasına neden olduğu tespit edildi. Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılması İ/R sürecinde artan *RIP1* protein düzeyini önemli ölçüde azaltarak oluşan doku hasarının gerilemesine neden olduğu belirlendi. Yapılan literatür taraması sonucunda probenecid uygulamasının ve her iki inhibitörün birlikte kullanımı ile ilgili olarak *RIPK1* protein düzeyi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya ulaşamadık.

5.3.4. *RIPK3* protein düzeyinin değerlendirilmesi

RIPK3 hem *RIPK1* ile etkileşime girerek hem de *RIPK1*'den bağımsız olarak nekroptozun oluşmasında, yine *MLKL*'yi aktive ederek, *MLKL*'nin sitoplazmadan hücre zarına taşınmasına sebep olarak, nekroptozun ilerlemesinde görev alır. (Kaiser et al., 2013; Nikseresht et al., 2019; Upton et al., 2012; Vanlangenakker et al., 2011).

Yang ve ark. ları fokal iskemiden 48 saat sonra RIP1, RIP3 ve MLKL mRNA düzeyleri belirgin şekilde arttığını tespit etmişlerdir (M. Yang et al., 2017). OSA tıkanması ile oluşturulan iskemi sonrası 6, 12 ve 24 saat olmak üzere farklı reperfüzyon süreçlerine maruz bırakılan sıçan beyinleri üzerinde yapılan bir çalışmada, RIP3 ve MLKL gen ifadelerinin reperfüzyon sonrası 24 saate kadar arttığı belirlenmiştir (Nikseresht et al., 2019). Vieira ve ark. yaptıkları bir çalışmada, iskemik hasarın RIP3 gen ifadesini arttırarak nöronlarda nekroptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. OGD'yi takip eden RIP3 mRNA düzeylerindeki artış protein düzeyindeki artışa sebep olarak 24 saat sonra *RIPK3* protein düzeyinin kontrol grubuna göre 1.5 kat attığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada ikinci bölüm olan global beyin iskemisi modelinde de RIP3 gen ifadesinin arttığı *in vivo* olarak gösterilmiştir. (Vieira et al., 2014)..

Beyin iskemi ve reperfüzyon hasarının *tümör nekroz faktör α reseptörü1* (*TNFR1*) ve *RIPK3* aktivasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada,

reperfüzyon sürecinde protein ifadesi artan *RIPK 3*'ün apoptoz inhibitörü Z-VAD-fmk kullanımını sonucunda daha da fazla yükseldiği ve böylece *RIPK3* aracılı nekroptozun kaspazların inhibe edilmesi ile artırıldığı belirlenmiştir (Dong et al., 2016). Nekroptozun hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar ile incelendiği bir makalede, OGD modelinde Z-VAD-fmk kullanımının RIP1, RIP3 gen ifadelerinin artırdığı ve bu artışın *RIPK1-RIPK3-MLKL* etkileşimlerini düzenlediği bildirilmiştir (Qu et al., 2016).

Çalışmamızda hem iki saatlik oluşturulan iskemi hem de bu iskemiye takip eden 24 saatlik reperfüzyon süreçlerinde *RIPK3* protein düzeyinin arttığı, apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak kullanımının İ/R sonucunda artan *RIPK3* protein düzeyini daha fazla arttırdığı belirlendi.

Yapılan çeşitli çalışmalarda *Pan1* kanallarının nörotoksisite ile ilişkisi gösterilmiş olmak ile birlikte (Bargiotas et al., 2011; Dvorianchikova et al., 2012; Makarenkova et al., 2018), günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Pan1* kanalları ve *RIPK3* arasında bir bağlantı rapor edilmemiştir. Çalışmamızda iki saatlik iskeminin 1. saati ile 24 saatlik reperfüzyon sürecinin 5. saatinde intraperitoneal olarak uygulanan *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecid İ/R sürecinde artan *RIPK3* düzeyini azaltmıştır. İlâveten Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanımının *RIPK3* düzeyini daha da düşürdüğü belirlendi.

5.3.5. *MLKL* protein düzeyinin değerlendirilmesi

Programlanmış bir hücre ölüm süreci olan nekroptozda anahtar rol oynayan *MLKL*, *RIPK3* tarafından fosforlanarak aktif hale geçer. *MLKL*, oligomerizasyonu sonrasında plazma zarına yerleşerek nekroptozun gerçekleştirilmesinde görev alır (Gong et al., 2017; Lee & Kang, 2019; Weber et al., 2018; Y. Xu et al., 2018; Yoon et al., 2017).

Travmatik beyin hasarı modeli ile yapılan bir çalışmada RIP1, RIP3 ve *MLKL* gen ifadeleri ve protein düzeylerinin kontrol ve sham gruplarına göre arttığı

belirlenmiştir (Z.-M. Liu et al., 2018). Farklı beyin İ/R modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda, oluşan nöronal nekroptoz sürecinde fosforlanarak aktif hale gelen *RIPK1* protein düzeyindeki artışın, *RIPK3*, *MLKL* ve *p-MLKL* protein düzeylerinin yükselmesine neden olduğu belirlenmiştir (Deng et al., 2019; J. Li et al., 2019; Nikseresht et al., 2019; Y. Zhou et al., 2017).

Çalışmamızda da literatür bilgileri ile uyumlu olarak, iki saatlik iskemi ve bu iskemiye takip eden yirmi dört saatlik reperfüzyon süreçlerinde *MLKL* protein düzeyinin arttığı belirlendi.

İ/R sürecinde oluşan nekroptozun hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak incelendiği çeşitli çalışmalarda Z-VAD-fmk kullanımının İ/R sürecinde artan *MLKL* protein düzeyi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Qu et al., 2016; X.-S. Yang et al., 2017). Bu literatürde elde edilen sonuçlara zıt olarak, yapılan bir çalışmada ise, makrofajların aktive edilmesi sonucunda nekroptozda rol alan *MLKL* düzeyinin arttığı ve Z-VAD-fmk uygulamasının hem artan *MLKL* düzeyinin daha fazla artmasını sağladığı hem de *p-MLKL* düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (Koike, Hanatani, & Fujimori, 2019).

Çalışmamızda da iskeminin birinci saati ile reperfüzyonun beşinci saatinde Z-VAD-fmk uygulaması *MLKL* gen ifadesinde istatistiksel olarak önemsiz olmak ile beraber hafif bir artışa neden olmak ile birlikte, *MLKL* protein düzeyinde önemli düzeyde artışa neden oldu.

Çalışmamızda *Pan1* kanal proteinlerinin nekroptoz üzerindeki etkileri araştırılması amaçlanmış olup bu nedenden dolayı *Pan1* kanal proteinlerinin probenecid ile engellenmesinin *MLKL* protein düzeyine etkisi araştırılmıştır. Bu konu ile ilişkili bir literatüre ulaşılamamıştır. Çalışmamızda *Pan1* kanallarının probenecid ile inhibe edilmesi sonucunda İ/R hasarında artan *MLKL* protein düzeyinin azaldığı belirlendi. Çalışmamızda ayrıca probenecidin tek başına kullanımının, Z-VAD-fmk ile birlikte kullanımı ile karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen iki inhibitörün birlikte

uygulanmasının İ/R hasarında artan *MLKL* protein düzeyini daha fazla azalttığı belirlendi.

5.3.6. *TNF- α* protein düzeyinin değerlendirilmesi

TNF- α inflamasyon, doku hasarı ve hücre ölümünde önemli bir role sahip olan bir pleiotropik sitokindir. Ayrıca Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin ifadesini uyararak NF- κ B yoluyla apoptozu inhibe edebilir. *TNFR1*'in *TNF- α* ile aktivasyonu hem apoptoz hem de nekroptoz ile sonuçlanabilir (Dondelinger et al., 2015; Y. Liu et al., 2019).

Kamışlı ve ark. nın sodyum kanal inhibitörlerinin global iskemi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, İ/R hasarının *kaspaz 3*, *kaspaz 8* ve *TNF- α* protein düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Kamışlı et al., 2019). Beyin İ/R hasarında karyofilenin nekroptotik nöronal ölüm ve inflamasyon yolları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon sürecinin farelerin beyin dokularında *TNF- α* ve *IL-1 β* protein düzeylerini sham grubuna kıyasla arttığı belirtilmiştir (M. Yang et al., 2017). Harrison ve ark. yaptıkları bir çalışmada, *TNF- α* gen ifadesinin İ/R sürecinin ilk altı saatinde hızlı bir şekilde arttığı ve bu artışın 24 saate kadar devam ederek protein düzeyinde de kendini gösterdiğini belirlemişlerdir (Harrison et al., 2000). Kumar ve ark.larının global iskemi modeli ile yaptıkları çalışmada *TNF- α* protein düzeyinin arttığı immünohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlenmiştir (Kumar et al., 2019). Vieira ve ark.larının hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada oksijen-glikoz mahrumiyeti (OGD) ile tetikledikleri hücre ölümünün, *TNF- α* inhibisyonu ile azaldığını belirleyerek, OGD'ye maruz kalan nöronlarda ölüm reseptörlerinin hem ekstrinsik apoptoza hem de nekroptoza sebep olduğunu göstermişlerdir (Vieira et al., 2014).

Çalışmamızda literatür bilgileri ile uyumlu olarak beyin dokusunda iki saatlik iskemi sürecinde *TNF-α* protein düzeyinin artmaya başladığı ve 24 saatlik reperfüzyon sürecinde bu artışın devam ettiği belirlendi.

TNF-α'nın otokrin üretimi ile ilişkili yapılan bir çalışmada, Z-VAD-fmk ile kaspazların inhibisyonunun *TNF-α* mRNA gen ifadesi ve protein düzeyini arttırdığı, bu sayede nekroptozun uyarıldığı belirtilmiştir (Y. Wu et al., 2011). Sıçanlarda endotoksin ile oluşturulan sepsis modeli üzerinde kaspaz inhibisyonunun kalp disfonksiyonunda etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, geniş spektrumlu kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanımının endotoksin kaynaklı kaspaz aktivitelerindeki (kaspaz 3, 8 ve 9) artışı önlediği fakat bu inhibitörün *IL-1β*, *TNF-α*, ve *IL-6* sitokin düzeylerini etkilemediği belirtilmiştir (Nevière, Fauvel, Chopin, Formstecher, & Marchetti, 2001).

Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna göre ki saatlik iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon sürecinde *TNF-α* düzeyi yükselmiş olup, Z-VAD-fmk'nın kullanımı bu yükseliş devam etmiştir. Dolayısıyla İ/R hasarı üzerine Z-VAD-fmk *TNF-α* düzeyinde önemli bir etki oluşturmamıştır.

Zhang ve ark. larının fareler üzerinde oluşturdukları sepsis ile ilişkili ensefalopati (SAE) modeli üzerinde probenecidin etkilerini araştırdıkları çalışmada beyin örneklerindeki *TNF-α*, *IL-6* ve *IL-1* protein düzeylerinin septik yaralanmadan 48 saat sonra hippokampüste yükseldiği, ancak bu düzeylerin probenecid ile tedavi edilen septik farelerin hippokampüsünde azaldığı saptanmıştır (Z. Zhang et al., 2019). *Pan1* kanalları ile başka literatürlere ulaşılammış olmak ile birlikte, çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatür bilgilerinde de ifade edildiği gibi iskeminin 1. saati ile reperfüzyonun 5. saatinde probenecidin intraperitoneal uygulaması İ/R sürecinde artan *TNF-α* protein düzeyini azaltmıştır.

Yaptığımız çalışmada beyin dokularında *TNF-α* protein düzeyini en etkili şekilde azaltarak İ/R hasarında oluşan inflamasyonu inhibe eden uygulamanın

hem apoptoz inhibitörü (Z-VAD-fmk) hem de *Pan1* inhibitörünün (probenecid) birlikte uygulanması olduğu belirlenmiştir. Bu konu ile ilişkili bir literatüre ulaşılammıştır.

5.3.7. *PARP* protein düzeyinin değerlendirilmesi

İskemik süreçte, kan akışının bozulması çeşitli biyolojik ve morfolojik süreçlerin aktive olmasını sağlar. İskemik alanda oksijen azlığının, zamanla enerji dengesini de bozmaya başlar. Beyinde iskemi ve reperfüzyon hasarında oksidatif stres önemli bir hasar oluşum mekanizması olup; proteinler, lipitler ve DNA dahil olmak üzere hücre bileşenlerine zarar veren ROT ve reaktif azot türlerinin üretilmesi nedeni ile bu stres daha da artar. Tüm bu doku hasarları hücre ölümüne neden olan moleküler süreçlerin tetiklenmesine sebep olur (Ashe & Berry, 2003; P. Li et al., 2018; Lietzau et al., 2009) Beyin iskemi reperfüzyon sürecinde oluşan çeşitli metabolik değişimler özellikle de oksidatif stresin artması sonucunda DNA'da hasarların oluşması, *poli-(ADP-riboz) polimeraz (PARP)* proteinin aktivasyonuna neden olur. *PARP*, DNA hasarını tamir etmeye başladığında, hücrenin NAD ve ATP'sini tüketerek hücrenin ölüm sürecine girmesini sağlar (Boulares et al., 1999). Bununla birlikte *PARP* aktivasyonunun sağlanamaması ve oksidatif stres artışı gibi durumlarda, DNA'da onarım olamadığından dolayı, DNA hasarı, hücre apoptozu indükleyen çoklu ölüm öncesi sinyal süreçlerini tetikler (P. Li et al., 2018).

Sıçanlarda OSA tıkanması ile oluşturulan beyin iskemi reperfüzyon hasarında pikrosidelin *kaspaz 3* ve *PARP* protein düzeyine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *kaspaz 3* ve *PARP* protein ifadesinin iki saatlik iskemi ve 22 saatlik reperfüzyon sürecinde arttığı belirlenmiştir (Qin, Guo, Zhen, & Xinying, 2010). Erkek sıçanlarda OSA tıkanması yöntemiyle oluşturulan beyin iskemi reperfüzyon modeli ile yapılan bir çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarının *PARP* protein düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (L. Chen et al., 2019; R. Zhang et al., 2015).

Çalışmamızda da literatür bilgileri ile uyumlu olarak, iki saatlik iskemik süreçte ve bu iskemik süreci takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde *PARP* protein düzeyinin arttığı belirlendi.

Beyin iskemi reperfüzyon sürecinde *PARP* hücrelerde kaspazlar veya katepsinler gibi çeşitli enzimleri tarafından kesilmesi ile inaktive edilebilir. Bu kesim sonucunda oluşan parçaların büyüklüğü kesimde hangi enzimin görev aldığı ve hangi hücre ölüm yolunun aktive olduğunu belirlemede kullanılır. *PARP*'ın kaspaz-3 ile kesimi, *PARP*'ı etkisiz hale getirme mekanizmasından birisi olup bu sayede apoptoz sırasında gerekli olan hücre enerji depoları korunur. (Besson, 2009; P. Li et al., 2018; R. Zhang et al., 2015). bir pan kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın aynı zamanda katepsinler ve kalpeinleri de inhibe etme özelliği bulunmaktadır (W. Wu, Liu, & Li, 2012). Nöronal apoptozda Z-VAD-fmk ve *PARP* inhibitörünün birlikte kullanılmasının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *PARP* kesiminin kaspaz 3'ün Z-VAD-fmk ile inhibisyonundan etkilenmediği belirlenmiştir (Yap, Tan, Ng, & Ng, 2008). Zhao ve ark. larının yaptıkları çalışmada ise pan kaspaz inhibitörünün kullanılmasının sonucunda aktif *PARP*, *kaspaz 3* ve *AIF* düzeyinin düştüğünü belirlemişlerdir (Zhao, Li, Hou, Jin, & Zhang, 2019). Kim ve ark. ları yaptıkları bir çalışmada, Z-VAD-fmk inhibitörü kullanımı sonucunda kaspaz aktivitesinin engellenmesinin *PARP* protein düzeyini azalttığını göstermişlerdir (S. K. Kim et al., 2015).

Çalışmamızda apoptoz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak kullanımının İ/R sonucunda artan *PARP* düzeyini azalttığı belirlendi.

Yapılan literatür taramalarında probenecid ve *PARP* proteinini ile ilgili literatürlere ulaşılammış olmakla birlikte, farklı bir *Pan1* kanal inhibitörü olan karbenoksolon kullanılarak yapılan bir çalışmada, , *Pan1* kanallarının kullanılan inhibitör sayesinde kapatılması ile hücre dışından NAD⁺ alımının kısıtlanmasının *PARP* aktivasyonunu ve buna bağlı olarak da *PARP* aracılı hücre ölümünü azalttığı belirlenmiştir (Okuda, Nishida, Higashi, & Nagasawa, 2013).

Çalışmamızda da karbenoksolon ve *PARP* ilişkisini belirten literatüre uygun olarak, iskemi sürecinin birinci ve reperfüzyon sürecinin beşinci saatinde intraperitoneal olarak uygulanan probenecidin İ/R sürecinde artan *PARP* düzeyini azalttığı belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada beyinde oluşturulan İ/R hasarında *PARP* protein düzeyini en etkili şekilde azaltan uygulamanın pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* protein/ *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecidin birlikte uygulaması olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında bu iki inhibitörün eş zamanlı kullanılması ile ilgili bilgiye ulaşmamıştır.

5.4. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Çeşitli çalışmalarda iskemi reperfüzyona maruz kalan dokulardaki hasarların incelenmesi amacı ile H&E boyamaları yapılmıştır. Yang ve ark. larının *in vivo* olarak yaptıkları çalışmada, sham grubundaki dokulardaki hücre yapılarının bozulmadığı, düzenli hücre yapısı gösterdiği belirlenirken, İ/R grubu dokularındaki hücrelerden elde ettikleri görüntülerde hücrelerin patolojik değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Bu grupta intact, hücre dışı çekirdekler ile nekrotik hücreler; hücre içerisinde yoğunlaşmış ve parçalanmış çekirdekler ile apoptotik hücreler belirlenmiştir. Çalışmalarında elde ettikleri sonuçları elektron mikroskopisi ile destekleyerek İ/R hasarında nekroptotik hücrelerin apoptotik hücrelerden daha fazla olduğunu vurgulamışlardır (M. Yang et al., 2017). Oluşturulan global beyin iskemi modeli ile yapılan bir çalışmada H&E boyama yöntemi ile enfarkt alan incelenerek, bu dokularda vakuolizasyon, küçük çekirdek ve parçalanmış sitoblast yapı gösteren deformasyonlar olduğu belirlenmiştir (Kumar et al., 2019). LPS tedavisinin İ/R hasarı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, H&E boyaması sonucunda nöron hücrelerinin, kontrol grubunda net sınırlar ve sağlam çekirdekler ile düzenli yapı gösterdikleri belirlenirken, İ/R grubundaki nöronal hücrelerin sınırlarının bozuk olduğu ve daha az görünür çekirdeği ile düzensiz yapı gösterdikleri belirlendi (He et al., 2019). Antiviral bir

madde olan germacronun beyin iskemisi ve reperfüzyon hasarında etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sham grubunda bulunan nöronların düzgün bir şekilde sıralı ve yapılarının bozulmamış olduğu belirlenirken, İ/R grubunda küçük, parçalanmış nöron çekirdekleri ile düzensiz nöron dizileri gözlenmiştir (T. Wu et al., 2019).

Çalışmamızda da literatürlerde belirtildiği gibi, K grubuna ait sıçan beyinlerinde normal görünümlü nöronlar ve glial hücreler gözlemlendi. Çalışmamızda iki saatlik iskemisi sonucunda dokularda kortikal alanda hasar ve çok sayıda nekrotik hücre yapılarının oluştuğu belirlendi. İskemik süreci takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde ağır vasküler kongesyon ve nekrotik hücre hasarının yanı sıra, iki saatlik iskemik sürece göre ağır hasarlı apoptotik hücre yüzdesinin arttığı belirlendi.

Fokal beyin iskemisi-reperfüzyon hasarına maruz kalan sıçanlarda *RIPK3* aracılı nekroptozun araştırıldığı bir çalışmada yapılan H&E boyama sonucunda Z-VAD-fmk uygulamasının İ/R sürecinde artan hasardan daha fazla olacak şekilde nöronal vakuolizasyonu arttırdığı ve piknotik çekirdekli nekrotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (Dong et al., 2016).

Çalışmamızda da literatür bilgisi ile uyumlu olarak, Z-VAD-fmk uygulamasının beyinde oluşan iskemisi ve reperfüzyon sürecinde artan apoptotik hücre sayısını azalttığı, fakat dokularda kortikal alanda normal nöronlar yanında çok sayıda nekrotik hücre bulunduğu belirlendi.

Çalışmamızda *Pan1* kanallarını bloke eden probenecid uygulamasının beyin dokularında iskemisi ve reperfüzyon sürecinde artan ağır hasarlı apoptotik hücre sayısını ve ağır hasarlı nekrotik hücre sayısını azalttığı belirlendi. Ayrıca hem probenecidin hem de Z-VAD-fmk birlikte kullanımının dokularda İ/R hasarı sonucunda oluşan hem ağır hasarlı apoptotik hücre hem de ağır hasarlı nekroptotik hücre yüzdesini eş zamanlı olarak azalttığı belirlendi. Histolojik

olarak elde ettiğimiz bu sonuçlarımız yaptığımız protein düzeyi ve gen ifadesi bulgularımızla uyumlu olup sonuçlarımızı desteklemektedir.

5.5. İmmünohistokimyasal Çalışma Bulgularının Değerlendirilmesi

5.5.1. Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi

Global iskemi modeli ile yapılan bir çalışmada, *kaspaz 3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada*, iskemi grubunda pozitif işaretlenmiş hücre oranının sham ve pozitif kontrol gruplarına kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (Kumar et al., 2019). Beyin İ/R hasarı ile yapılan çeşitli çalışmalarda, iskemi reperfüzyon sürecinin *kaspaz 3* protein düzeyini arttırarak *kaspaz 3* antikoru ile işaretlenen hücre sayısını arttığı bildirilmiştir (Chaitanya & Babu, 2009; Krajewska et al., 2011; J. Li, Han, Ma, & Qi, 2010; Özbal et al., 2008). Yapılan çalışmalarda bu süreçlerde uygulanan pan kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk'nın *kaspaz 3*'ün katalitik bölgesine bağlanarak, İ/R hasarında artan *kaspaz 3* protein düzeyini ve *kaspaz 3* antikoru ile işaretlenen hücre sayısını azalttığı ileri sürülmüştür (Han et al., 2002; Park et al., 2004).

Pan1 proteinleri ve inhibitörleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda, *Pan1* kanal proteinlerinin inhibisyonu sayesinde *kaspaz 3* aktivasyonunu engellendiği ve böylece nöronal hücre ölümünün azaldığı belirtilmiştir (Jackson et al., 2014; Pina-Benabou et al., 2005; L. Zhou et al., 2018).

Çalışmamızda *kaspaz 3* düzeyinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve pan kaspaz inhibitörünün kullanıldığı ZVAD ve ZP gruplarında kontrol grubuna en yakın *kaspaz 3* düzeyine ulaştığı belirlendi. Elde ettiğimiz immünohistokimyasal çalışmalarımız, hem kaspaz 3 gen ifadesi hem de protein düzeyi ile uyumluluk göstermektedir.

5.5.2. Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal olarak yapılan çalışmalarda beyin iskemisi reperfüzyon sürecinde, apoptotik yollarda önemli bir rol oynayan *kaspaz 8* düzeyinin arttığı belirtilirken (Harrison et al., 2001; Morita-Fujimura et al., 2001), kaspaz inhibitörlerinin kullanılmasının iskemisi sürecinde artan kaspaz 8 protein düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Krupinski et al., 2000).

Çalışmamızda kaspaz 8 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda *kaspaz 8* protein düzeyinin İ/R sürecinde en yüksek düzeye ulaştığı ve pan kaspaz inhibitörünün kullanıldığı ZVAD ve ZP gruplarında kontrol grubuna en yakın *kaspaz 8* protein düzeyine ulaştığı belirlendi.

5.5.1. RIPK3 antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi

İki saat iskemisi ve arkasından yapılan 6, 12, 24 ve 72 saatlik reperfüzyon uygulanan sıçanların beyin dokularında yapılan *RIPK3* immünohistokimyasal çalışmalarında her bir reperfüzyon sürecinde *RIPK3* pozitif hücrelerin sham grubuna göre arttığı belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada İ/R grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-fmk kullanılan grup dokularında *RIPK3* pozitif hücrelerin sayısında da arttığı bildirilmiştir (Dong et al., 2016).

Çalışmamızda iki saatlik iskemisi ve yirmi dört saatlik reperfüzyon uygulaması sonucunda *RIPK3* antikoru ile boyanan beyin hücrelerinde iskemisi ve iskemisi reperfüzyon gruplarında *RIPK3* pozitif hücreler artarken, ZVAD uygulamasını takiben bu artış daha da fazlalaşmış, buna karşılık probenecid ve iki inhibitörün birlikte kullanıldığı PRB ve ZP gruplarında bu tip hücre yüzdesi azalmakla birlikte yine de kontrol grubuna nazaran yüksek olduğu belirlendi.

5.5.4. *MLKL antikoru ile immünohistokimyasal çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi*

Primer nöron kültürü ile yapılan bir çalışmada, OGD ve sonrasında reperfüzyonun sağlandığı grupta *MLKL düzeyinin* arttığı gösterilmiştir (M. Yang et al., 2017). Fareler üzerinde OSA tıkanması ile oluşturulan beyin iskemi çalışmasında *MLKL* ifadesinin İ/R sürecinde arttığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Y. Zhou et al., 2017). *MLKL* inhibisyonunun beyindeki hipoksi-iskemi kaynaklı nöronal hasar üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, beyin dokusunda immünohistokimyasal boyama sonucunda Z-VAD-fmk uygulamasının *RIPK1* ve *RIPK3* protein düzeyinin arttığı belirlenirken *MLKL protein* düzeyinde fark belirlenmemiştir (Qu et al., 2016).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, iskemi sonucunda orta boyanan *MLKL* pozitif hücreler artarken, reperfüzyon sonucunda ağır boyanan *MLKL* pozitif hücreler daha fazla artmıştır. İki saatlik iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon sürecinde uygulanan ZVAD fmk'nın bu artan ağır hasarlı *MLKL* pozitif hücre sayısını nispeten azaltmasına karşılık probenecid uygulanması orta ve ağır hasarlı pozitif hücre sayısını azaltırken hafif hasarlı hücreler üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi. Yapılan literatür taramalarında probenecid ve iki inhibitörün birlikte kullanılarak yapıldığı çalışmalara rastlanmamıştır.

5.6. TUNEL Bulgularının Değerlendirilmesi

Fokal serebral iskemi sonrası n-asetil-sisteinin uygulanmasının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sham grubu örneklerinde TUNEL negatif olduğu belirlenirken, 30 dakika ve sonrasındaki 24 saatlik reperfüzyon sürecinde TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı belirlenmiştir (Khan et al., 2004). İ/R oluşturulan beyin hasarı sonucunda görülen temel hücre ölüm tiplerinin araştırıldığı bir çalışmada, TUNEL ve kaspaz 3 antikoru ile eş zamanlı boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada İ/R grubundaki iskemik alanda çoğu hücrenin

TUNEL pozitif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada serebral korteks doku örneklerinde çok az hücrenin piknotik ekirdekli TUNEL pozitif olduğu ve *kaspaz 3* antikoru ile pozitif boyandığı belirlenirken (apoptoz), geriye kalan çoğu hücrenin apoptoz benzeri nükleer yoğunlaşma özelliği göstermediği ve *kaspaz 3* ile etkileşime girmediği belirlenmiştir (nekroz). Beyin rneklerinin hippokampal CA1 alanında tüm nöronların TUNEL pozitif olduğu fakat *kaspaz 3* ile etkileşime girmediği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, İ/R yaralanmasının neden olduğu korteks hücre ölümünün kısmen nekroz geçirdiğini ve hippokampal CA1 nöronal ölümünün esas olarak nekroptoz olduğu ileri sürülmüştür (M. Yang et al., 2017). Yüksek potasyum n-koşullanmasının nöronal apoptoz üzerindeki etkisinin TUNEL ve DAPI boyama ile incelendiği bir çalışmada İ/R grubunda apoptoz yüzdesinin arttığı belirlenmiştir (Tan et al., 2019).

Çalışmamızda literatür bilgileri ile uyumlu olarak, beyin dokusunda kan akımının engellenmesi ile oluşturulan iki saatlik iskemik süreçte dokuyu oluşturan hücrelerin apoptoz ölüm yolağına girdikleri ve oluşturulan bu iki saatlik iskemi sonrasında kan akımının yeniden sağlandığı 24 saatlik reperfüzyon sürecinde daha fazla apoptotik hücre oranının görüldüğü belirlendi.

Beyin iskemi reperfüzyon modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda, Z-VAD-fmk uygulamasının İ/R sürecinde artan TUNEL pozitif hücre sayısını azalttığı bildirilmiştir (Endres et al., 1998; L. Wei, Ying, Cui, Langsdorf, & Yu, 2004; L. Zhang et al., 2017).

Çalışmamızda iskeminin birinci saatinde ve reperfüzyonun 5. saatinde Z-VAD-fmk'nın intraperitoneal olarak uygulanmasının, İ/R sürecinde artan apoptoz yüzdesini azalttığı belirlendi.

Çalışmamızda *Pan1* kanalarını bloke eden probenecid uygulamasının beyin dokularında iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan apoptoz yüzdesini azalttığı fakat bu azaltışın Z-VAD-fmk uygulaması kadar etkili olmadığı belirlendi. İ/R

hasarında probenecid ve iki inhibitörün birlikte kullanılmasının apoptoz yüzdesi ile ilişkisinin incelendiği bir literatüre ulaşılamamıştır. Çalışmamızda hem apoptoz inhibitörü Z-VAD-fmk hem de *Pan1* protein kanal inhibitörü olan probenecidin birlikte kullanılmasının İ/R sürecinde artan apoptoz yüzdesini azalttığı ve bu etkinin Z-VAD-fmk uygulaması ile eş etkiye sahip olduğu belirlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında deneysel olarak oluşturulan beyin iskemi/reperfüzyon hasarında panneksin-1 proteininin apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla iskemi reperfüzyon modelinin oluşturulması için deney hayvanların sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak iki saatlik iskemi süreci oluşturulurken, İ/R hasarı grupları için iki saatlik iskemi sonrasında klemler açılarak kan akımının sağlanmaya başlaması ile 24 saatlik reperfüzyon süreci oluşturuldu. İlgili gruplara **Şekil 3.1'de** belirtilen uygulamalar yapıldı. Deney hayvanları ile yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen beyin dokusu örnekleri kullanılarak *Pan1* kanallarının apoptoz ile ilişkisinin belirlenmesi için kaspaz 3, kaspaz 8, nekroptoz ile ilişkisinin belirlenmesi için RIP1, RIP3, MLKL gen ifadeleri ve protein düzeyleri belirlendi. Ayrıca bu yollarla ilişkili olan inflamasyon belirteci olan *TNF-α* ve DNA hasarı ve apoptoz belirleyicisi olan *PARP* protein düzeyleri belirlendi. *Kaspaz 3*, *kaspaz 8*, *RIPK3* ve *MLKL* antikorları kullanılarak immünohistokimyasal çalışmalar yapılarak protein düzeylerinin dokularda birikimi belirlendi. TTC boyama yapılarak İ/R hasarı makroskopik olarak değerlendirilirken, TUNEL yöntemi ile dokularda apoptoz oranları belirlendi.

Yapılan çalışmaların değerlendirilmesi ile aşağıda verilen sonuçlara ulaşıldı.

1. Deney gruplardan elde edilen beyin örneklerinden hazırlanan koronal dilimlerinin TTC ile boyanarak makroskopik olarak incelenmesi sonucunda, sağ arteria carotis communis'e klemp takılarak oluşturulan 2 saatlik iskemi sonucunda beyin dokusunda iskemik hasar olduğu ve bu hasarın iskemiye takip eden 24 saatlik reperfüzyon sürecinde beyinin iki hemisferine yayıldığı belirlendi. Ayrıca yaptığımız çalışma sonucunda hem probenecid hem de Z-VAD-fmk'nın birlikte uygulamasının beyin dokusunda oluşan İ/R hasarının geriletmesinde etkili bir yöntem olduğu makroskopik olarak belirlendi.

2. Kaspaz 3 gen ifadesi ve protein düzeyi ile ilgili yaptığımız çalışmalar sonucunda, yalnızca pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk değil, aynı zamanda *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecidin, İ/R sürecinde artan kaspaz 3 gen ifadesi ve protein düzeyini düşürdüğü fakat Z-VAD -fmk kadar etkili olmadığı belirlendi.
3. Kaspaz 8 gen ifadesi ve protein düzeyi ile ilgili yaptığımız çalışmalar sonucunda, Z-VAD-fmk uygulaması ile her iki inhibitörün birlikte uygulanmasının İ/R nedeni ile artan kaspaz 8 gen ifadesini azaltmada aynı etkiye sahip olduğu belirlenirken kaspaz 8 protein düzeyi bakımından Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanılmasının *kaspaz 8* protein düzeyini daha da fazla düşürdüğü belirlendi.
4. RIP1 gen ifadesi ve protein düzeyi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, *Pan1* inhibitörü olan probenecidin tek başına kullanımının RIP1 gen ifadesinin ve protein düzeyinin azalmasına neden olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda probenecid kullanımı sonucunda *Pan1* kanallarının kapatılması, dokunun ikincil hasara maruz kalarak TLR artışını engellemiş, böylece nekroptozu engelleyerek RIP1 gen ifadesini azaltmıştır. Ayrıca iki inhibitörün birlikte kullanımı ile İ/R sürecinde artan *RIP1* protein düzeyini önemli ölçüde azalttığı belirlendi.
5. Çalışmamızda iki saatlik iskeminin 1. saati ile 24 saatlik reperfüzyon sürecinin 5. saatinde intraperitoneal olarak uygulanan *Pan1* kanal inhibitörü olan probenecid İ/R sürecinde artan RIP3 gen ifadesi ve protein düzeyini azalttığı, Z-VAD-fmk ve probenecidin birlikte kullanımının RIPK3 düzeyini daha da düşürdüğü belirlendi.
6. Çalışmamız sonucunda *Pan1* kanallarının, probenecid ile inhibe edilmesi sonucunda İ/R hasarında artan MLKL gen ifadesinin ve protein düzeyinin azaldığı belirlendi. Ayrıca, probenecidin tek başına kullanımının Z-VAD-fmk ile birlikte kullanımı ile karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel

- olarak fark bulunmamasına rağmen iki inhibitörün birlikte uygulanmasının İ/R hasarında artan MLKL gen ifadesini ve protein düzeyini daha fazla azalttığı belirlenmiştir.
7. Çalışmamızda beyin İ/R hasarında Z-VAD-fmk, *TNF-α* düzeyinde önemli bir etki oluşturmadığı fakat iskeminin 1. saati ile reperfüzyonun 5. saatinde probenecidin intraperitoneal uygulaması İ/R sürecinde artan *TNF-α* protein düzeyini azalttığı belirlendi. Ayrıca çalışmamızda beyin dokularında *TNF-α* protein düzeyini en etkili şekilde azaltarak İ/R hasarında oluşan inflamasyonu inhibe eden uygulamanın hem apoptoz inhibitörü hem de *Pan1* inhibitörünün birlikte uygulanması olduğu belirlendi.
 8. Yaptığımız çalışmada beyinde oluşturulan İ/R hasarında *PARP* protein düzeyini en etkili şekilde azaltan uygulamanın pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve *Pan1* protein/*Pan1* kanal inhibitörü olan probenecidin birlikte uygulanması olduğu belirlenmiştir.
 9. Çalışmamızda, Z-VAD-fmk uygulamasının beyinde oluşan iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan apoptotik hücre sayısını azalttığı, fakat kortikal alanda çok sayıda nekrotik hücre bulunduğu belirlendi. *Pan1* kanallarını bloke eden probenecid uygulamasının beyin dokularında iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan ağır hasarlı apoptotik hücre sayısını ve ağır hasarlı nekrotik hücre sayısını azalttığı belirlendi. Ayrıca hem probenecidin hem de Z-VAD-fmk birlikte kullanımının dokularda İ/R hasarı sonucunda oluşan hem ağır hasarlı apoptotik hücre hem de ağır hasarlı nekroptotik hücre yüzdesini eş zamanlı olarak azalttığı belirlendi.
 10. Yapılan TUNEL çalışmaları sonucunda *Pan1* kanallarını bloke eden probenecid uygulamasının beyin dokularında iskemi ve reperfüzyon sürecinde artan apoptoz yüzdesini azalttığı fakat bu azaltışın Z-VAD-fmk uygulaması kadar etkili olmadığı belirlendi.
 11. Yaptığımız çalışma sonucunda deneysel olarak oluşturulan İ/R modelinde eş zamanlı olarak hem apoptoz hem de nekroptoz hücre ölümleri görüldüğü

belirlendi. Yapılan histolojik değerlendirme ve gruplar arası karşılaştırmalar sonucunda iki saatlik iskemi oluşturulan grupta ağır hasarlı nekroptotik hücreslerin, iki saat iskemi sonrasında 24 saat reperfüzyon oluşturulmuş grupta apoptotik hücreslerin daha fazla olduğu belirlendi.

12. *Pan1* proteinlerinin İ/R hasarında hem apoptoz hem de nekroptozun ilerlemesinde görev aldığı ve bu nedenle *Pan1* proteinlerinin oluşturduğu kanalların bloke edilmesinin beyin İ/R sürecinde oluşan hasarı azalttığı belirlendi.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen beyin iskemi ve reperfüzyon sürecinde hem apoptotik hem nekroptotik hücreslerin görüldüğü, İ/R sürecinde oluşan hücre hasarlarını uygulanan pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk'nın bir dereceye kadar azaltırken *Pan1* inhibitörü probenecidin önemli düzeyde azaltarak reperfüzyon hasarında etkili bir terapötik ajan olduğu ve bu amaçla kullanılabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguirre, A., Shoji, K. F., Sáez, J. C., Henríquez, M., & Quest, A. F. (2013). FasL-triggered death of Jurkat cells requires caspase 8-induced, ATP-dependent cross-talk between fas and the purinergic receptor P2X7. *Journal of cellular physiology*, 228(2), 485-493.
- Allen, C., & Bayraktutan, U. (2009). Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *International journal of stroke*, 4(6), 461-470.
- Amani, H., Habibbey, R., Shokri, F., Hajmiresmail, S. J., Akhavan, O., Mashaghi, A., & Pazoki-Toroudi, H. (2019). Selenium nanoparticles for targeted stroke therapy through modulation of inflammatory and metabolic signaling. *Scientific reports*, 9(1), 6044.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L., Donnan, G., & Hennerici, M. (2009). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovascular diseases*, 27(5), 493-501.
- Ashe, P. C., & Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), 199-214.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., . . . Litvin, O. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 83(4), 706-716.
- Bargiotas, P., Krenz, A., Hormuzdi, S. G., Ridder, D. A., Herb, A., Barakat, W., . . . Schwaninger, M. (2011). Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20772-20777.
- Baudoux, T. E., Pozdzik, A. A., Arlt, V. M., De Prez, E. G., Antoine, M.-H., Quellard, N., . . . Nortier, J. L. (2012). Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. *Kidney international*, 82(10), 1105-1113.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 135-147.
- Besson, V. C. (2009). Drug targets for traumatic brain injury from poly (ADP-ribose) polymerase pathway modulation. *British journal of pharmacology*, 157(5), 695-704.
- Bonaventura, A., Liberale, L., Vecchié, A., Casula, M., Carbone, F., Dallegri, F., & Montecucco, F. (2016). Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1967.
- Bond, S., & Naus, C. C. (2014). The pannexins: past and present. *Frontiers in physiology*, 5, 58.
- Bosco, D., Haefliger, J.-A., & Meda, P. (2011). Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiological reviews*, 91(4), 1393-1445.
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., & Smulson, M. (1999). Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22932-22940.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Boyd-Tressler, A., Penuela, S., Laird, D. W., & Dubyak, G. R. (2014). Chemotherapeutic drugs induce ATP release via caspase-gated pannexin-1 channels and a caspase/pannexin-1-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27246-27263.
- Broughton, B. R., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5), e331-e339.
- Campos-Arroyo, D., Maldonado, V., Bahena, I., Quintanar, V., Patiño, N., Carlos Martinez-Lazcano, J., & Melendez-Zajgla, J. (2016). Probenecid sensitizes neuroblastoma cancer stem cells to cisplatin. *Cancer investigation*, 34(3), 155-166.
- Chaitanya, G. V., & Babu, P. P. (2009). Differential PARP cleavage: an indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat. *Cellular and molecular neurobiology*, 29(4), 563-573.
- Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R. A., Zhu, R. L., Graham, S. H., & Simon, R. P. (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 4914-4928.
- Chen, K., Demarco, B., Heilig, R., Shkarina, K., Boettcher, A., Farady, C. J., . . . Broz, P. (2019). Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP 3 inflammasome assembly. *The EMBO journal*, 38(10), e101638.
- Chen, L., Liu, D.-n., Wang, Y., Liu, X.-y., Han, S., Zhang, K., . . . Wang, J.-h. (2019). Treatment with MQA, a Derivative of Caffeoylquinic Acid, Provides Neuroprotective Effects against Cerebral Ischemia Through Suppression of the p38 Pathway and Oxidative Stress in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 67(4), 604-612.
- Chen, W. W., Yu, H., Fan, H. B., Zhang, C. C., Zhang, M., Zhang, C., . . . Geng, D. (2012). RIP1 mediates the protection of geldanamycin on neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation combined with zVAD in primary cortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 120(1), 70-77.
- Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2019). Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight*, 4(15).
- Christophe, M., & Nicolas, S. (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Current pharmaceutical design*, 12(6), 739-757.
- Culman, J., Nguyen-Ngoc, M., Glatz, T., Gohlke, P., Herdegen, T., & Zhao, Y. (2012). Treatment of rats with pioglitazone in the reperfusion phase of focal cerebral ischemia: a preclinical stroke trial. *Experimental neurology*, 238(2), 243-253.
- De Groot, H., & Rauen, U. (2007). *Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review*. Paper presented at the Transplantation proceedings.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., . . . Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, 1(2), 112.
- Deng, X.-X., Li, S.-S., & Sun, F.-Y. (2019). Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling. *Aging and disease*, 10(4), 807.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P. J., . . . Vandenabeele, P. (2015). NF- κ B-independent role of IKK α /IKK β in preventing RIPK1 kinase-dependent apoptotic and necroptotic cell death during TNF signaling. *Molecular cell*, *60*(1), 63-76.
- Dong, Y., Bao, C., Yu, J., & Liu, X. (2016). Receptor-interacting protein kinase 3-mediated programmed cell necrosis in rats subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Molecular medicine reports*, *14*(1), 728-736.
- Douanne, T., André-Grégoire, G., Feyeux, M., Hulin, P., Gavard, J., & Bidère, N. (2019). Pannexin-1 Channels govern the Generation of Necroptotic small Extracellular Vesicles. *bioRxiv*, 537753.
- Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, *55*(3), 310-318.
- Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Barakat, D., Grinberg, A., Wen, R., Slepak, V. Z., & Shestopalov, V. I. (2012). Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PloS one*, *7*(2), e31991.
- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gómez-Isla, T., . . . Moskowitz, M. A. (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *18*(3), 238-247.
- Fakharnia, F., Khodagholi, F., Dargahi, L., & Ahmadiani, A. (2017). Prevention of cyclophilin D-mediated mPTP opening using cyclosporine-A alleviates the elevation of necroptosis, autophagy and apoptosis-related markers following global cerebral ischemia-reperfusion. *Journal of Molecular Neuroscience*, *61*(1), 52-60.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, *4*(5), 330.
- Fayaz, S. M., Suvanish Kumar, V., & Rajanikant, G. (2014). Necroptosis: who knew there were so many interesting ways to die? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, *13*(1), 42-51.
- Festjens, N., Berghe, T. V., Cornelis, S., & Vandenabeele, P. (2007). RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell death and differentiation*, *14*(3), 400.
- Fulda, S. (2013). The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. *Cancer biology & therapy*, *14*(11), 999-1004.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Andrews, D. W. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, *25*(3), 486.
- Gamache, D. A., & Ellis, E. F. (1986). Effect of dexamethasone, indomethacin, ibuprofen, and probenecid on carrageenan-induced brain inflammation. *Journal of neurosurgery*, *65*(5), 686-692.
- Gewies, A. (2003). Introduction to apoptosis. *Apo Review*, *3*(1), 1-26.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Gong, Y.-N., Guy, C., Crawford, J. C., & Green, D. R. (2017). Biological events and molecular signaling following MLKL activation during necroptosis. *Cell Cycle*, 16(19), 1748-1760.
- Graham, S. H., & Chen, J. (2001). Programmed cell death in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(2), 99-109.
- Grootjans, S., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell death and differentiation*, 24(7), 1184.
- Gupta, Y., & Briyal, S. (2004). Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *Indian J Physiol Pharmacol*, 48(4), 379-394.
- Güneş, H. V. (2014). *Moleküler Hücre Biyolojisi* (2. Baskı ed.): İstanbul Tıp Kitapevi.
- Hakim, A. M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 14(4), 557-559.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J., & Javadov, S. A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular research*, 61(3), 372-385.
- Halonen, S. K. (2016). Modulation of Host Programmed Cell Death Pathways by the Intracellular Protozoan Parasite, *Toxoplasma gondii* — Implications for Maintenance of Chronic Infection and Potential Therapeutic Applications. In N. T. M. (Ed.), *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis* (pp. 374-393): InTech.
- Han, B. H., Xu, D., Choi, J., Han, Y., Xanthoudakis, S., Roy, S., . . . Siman, R. (2002). Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 30128-30136.
- Hara, H., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., . . . Moskowitz, M. A. (1997). Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), 2007-2012.
- Harrison, D., Davis, R. P., Bond, B. C., Campbell, C. A., James, M. F., Parsons, A. A., & Philpott, K. L. (2001). Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Molecular brain research*, 89(1-2), 133-146.
- Harrison, D., Roberts, J., Campbell, C., Crook, B., Davis, R., Deen, K., . . . Stammers, M. (2000). TR3 death receptor expression in the normal and ischaemic brain. *Neuroscience*, 96(1), 147-160.
- He, F., Zhang, N., Lv, Y., Sun, W., & Chen, H. (2019). Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats. *Molecular medicine reports*, 19(3), 1443-1452.
- Heckmann, B. L., Tummers, B., & Green, D. R. (2019). Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death & Differentiation*, 26(1), 41-52.
- Heiss, W.-D. (2000). Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(9), 1276-1293.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Herdegen, T., & Delgado-Garcia, J. (2007). *Brain damage and repair: from molecular research to clinical therapy* (Vol. 142): Springer Science & Business Media.
- Hribljan, V., Lisjak, D., Petrović, D. J., & Mitrečić, D. (2019). Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: from pathogenesis to therapeutic possibilities. *Croatian medical journal, 60*(2), 121.
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical neurology, 66*(3), 232-245.
- Iadecola, C., & Alexander, M. (2001). Cerebral ischemia and inflammation. *Current opinion in neurology, 14*(1), 89-94.
- Isayama, K., Pitts, L. H., & Nishimura, M. C. (1991). Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke, 22*(11), 1394-1398.
- Jackson, D. G. (2015). *Activation and Inhibition of Pannexin 1 Channels*.
- Jackson, D. G., Wang, J., Keane, R. W., Scemes, E., & Dahl, G. (2014). ATP and potassium ions: a deadly combination for astrocytes. *Scientific reports, 4*, 4576.
- Jian, Z., Ding, S., Deng, H., Wang, J., Yi, W., Wang, L., . . . Xiong, X. (2016). Probenecid protects against oxygen–glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain research, 1643*, 123-129.
- Johnson, W., Onuma, O., Owolabic, M., & Sachdeva, S. (2016). Stroke: a global response is needed. *Bulletin of the World Health Organization, 94*(9), 634.
- Kabra, D. G., Thiyagarajan, M., Kaul, C. L., & Sharma, S. S. (2004). Neuroprotective effect of 4-amino-1, 8-naphthalimide, a poly (ADP ribose) polymerase inhibitor in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rat. *Brain research bulletin, 62*(5), 425-433.
- Kaiser, W. J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J. W., Gough, P. J., . . . Mocarski, E. S. (2013). Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *Journal of Biological Chemistry, 288*(43), 31268-31279.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology, 298*, 229.
- Kam, P., & Ferch, N. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia, 55*(11), 1081-1093.
- Kamisli, S., Basaran, C., Batcioglu, K., Oztanir, M. N., Gul, M., Satilmis, B., . . . Genc, M. (2019). Neuroprotective effects of the new Na channel blockers rs100642 in global ischemic brain injury. *Archives of medical science: AMS, 15*(2), 467.
- Kanno, H., Ozawa, H., Tateda, S., Yahata, K., & Itoi, E. (2015). Upregulation of the receptor-interacting protein 3 expression and involvement in neural tissue damage after spinal cord injury in mice. *BMC neuroscience, 16*(1), 62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Kataoka, T., & Tschopp, J. (2004). N-terminal fragment of c-FLIP (L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF- κ B signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 24(7), 2627-2636.
- Kerrigan, C. L., & Stotland, M. A. (1993). Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*, 14(3), 165-175.
- Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A. G., Sekhon, C., . . . Singh, A. K. (2004). Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *Journal of neuroscience research*, 76(4), 519-527.
- Kim, S. K., Kim, W.-J., Yoon, J.-H., Ji, J.-H., Morgan, M. J., Cho, H., . . . Kim, Y.-S. (2015). Upregulated RIP3 Expression Potentiates MLKL Phosphorylation-Mediated Programmed Necrosis in Toxic Epidermal Necrolysis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(8), 2021-2030.
- Kim, Y., Davidson, J. O., Green, C. R., Nicholson, L. F., O'Carroll, S. J., & Zhang, J. (2017). Connexins and Pannexins in cerebral ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*.
- Kim-Campbell, N., Gomez, H., & Bayir, H. (2019). Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis. In *Critical Care Nephrology* (pp. 113-121. e112): Elsevier.
- Knapp, L., Gellért, L., Herédi, J., Kocsis, K., Oláh, G., Fuzik, J., . . . Farkas, T. (2014). A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischaemia in the rat. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40(5), 603-609.
- Koike, A., Hanatani, M., & Fujimori, K. (2019). Pan-caspase inhibitors induce necroptosis via ROS-mediated activation of mixed lineage kinase domain-like protein and p38 in classically activated macrophages. *Experimental cell research*, 380(2), 171-179.
- Krajewska, M., You, Z., Rong, J., Kress, C., Huang, X., Yang, J., . . . Hu, Y. (2011). Neuronal deletion of caspase 8 protects against brain injury in mouse models of controlled cortical impact and kainic acid-induced excitotoxicity. *PLoS one*, 6(9), e24341.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E., . . . Green, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3.
- Krupinski, J., Lopez, E., Marti, E., & Ferrer, I. (2000). Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiology of disease*, 7(4), 332-342.
- Kumar, G., Mukherjee, S., Paliwal, P., Singh, S. S., Birla, H., Singh, S. P., . . . Patnaik, R. (2019). Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1-17.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis—an introduction. *Bioessays*, 25(9), 888-896.
- Lee, K.-H., & Kang, T.-B. (2019). The Molecular Links between Cell Death and Inflammasome. *Cells*, 8(9), 1057.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Li, H., Colbourne, F., Sun, P., Zhao, Z., & Buchan, A. M. (2000). Caspase Inhibitors Reduce Neuronal Injury After Focal but Not Global Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*, *31*(1), 176-182. doi:doi:10.1161/01.STR.31.1.176
- Li, J., Han, B., Ma, X., & Qi, S. (2010). The effects of propofol on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following forebrain ischemia–reperfusion in rats. *Brain research*, *1356*, 11-23.
- Li, J., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Z., Song, Y., Wei, S., . . . Cheng, J. (2019). TRAF2 protects against cerebral ischemia-induced brain injury by suppressing necroptosis. *Cell death & disease*, *10*(5), 328.
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., . . . Chen, J. (2018). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, *134*, 208-217.
- Li, S., Bjelobaba, I., & Stojilkovic, S. S. (2018). Interactions of Pannexin1 channels with purinergic and NMDA receptor channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1860*(1), 166-173.
- Li, X., Cheng, S., Hu, H., Zhang, X., Xu, J., Wang, R., & Zhang, P. (2019). Progranulin protects against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting necroptosis and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*.
- Lietzau, G., Kowiański, P., Karwacki, Z., Dziewiątkowski, J., Witkowska, M., Sidor-Kaczmarek, J., & Moryś, J. (2009). The molecular mechanisms of cell death in the course of transient ischemia are differentiated in evolutionary distinguished brain structures. *Metabolic brain disease*, *24*(3), 507.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z.-g. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development*, *13*(19), 2514-2526.
- Linkermann, A., Bräsen, J. H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T. B., Kunzendorf, U., & Krautwald, S. (2012). Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney international*, *81*(8), 751-761.
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, *370*(5), 455-465.
- Liu, G., Wang, T., Wang, T., Song, J., & Zhou, Z. (2013). Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomedical reports*, *1*(6), 861-867.
- Liu, S. Q., Claudie, P., Alain, G., Stéphane, A., Korayem, M. H., Rastegar, Z., . . . Zhang, Y. J. (2019). Systems Neuroprotective Mechanisms in Ischemic Stroke.
- Liu, T., Bao, Y., Wang, Y., & Jiang, J. (2015). The role of necroptosis in neurosurgical diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *48*(4), 292-298.
- Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., . . . Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy. *International journal of molecular medicine*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Liu, Z.-M., Chen, Q.-X., Chen, Z.-B., Tian, D.-F., Li, M.-C., Wang, J.-M., . . . Li, F. (2018). RIP3 deficiency protects against traumatic brain injury (TBI) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis: Dependent on AMPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 499(2), 112-119.
- Macdonald, R. L., & Stoodley, M. (1998). Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurologia medico-chirurgica*, 38(1), 1-11.
- MacManus, J. P., & Linnik, M. D. (1997). Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 17(8), 815-832.
- Maes, M., Decrock, E., Cogliati, B., Oliveira, A. G., Marques, P. E., Dagli, M. L., . . . Vanhaecke, T. (2013). Connexin and pannexin (hemi) channels in the liver. *Frontiers in physiology*, 4.
- Makarenkova, H. P., Shah, S. B., & Shestopalov, V. I. (2018). The two faces of pannexins: new roles in inflammation and repair. *Journal of inflammation research*, 11, 273.
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., Herman, A. G., & Meyer, G. R. D. (2006). z-VAD-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy*, 2(4), 312-314.
- Mehta, S. L., Manhas, N., & Raghbir, R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews*, 54(1), 34-66.
- Mir, M. A., Al-Baradie, R. S., & Alhussainawi, M. D. (2014). Pathophysiology of Strokes. In *Recent Advances in Stroke Therapeutics*.: Nova Science Publishers, Inc.
- Misra, A., Rai, S., & Misra, D. (2016). Functional role of apoptosis in oral diseases: An update. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 20(3), 491.
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Yoshimoto, T., & Chan, P. H. (2001). Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. *Stroke*, 32(10), 2356-2361.
- Nakayama, T., Nagata, E., Masuda, H., Asahara, T., & Takizawa, S. (2019). Regeneration-associated cell transplantation contributes to tissue recovery in mice with acute ischemic stroke. *PloS one*, 14(1), e0210198.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., . . . Moskowitz, M. A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 18(10), 3659-3668.
- Nevière, R., Fauvel, H., Chopin, C., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2001). Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163(1), 218-225.
- Ni, Y., Gu, W.-W., Liu, Z.-H., Zhu, Y.-M., Rong, J.-G., Kent, T. A., . . . Zhang, H.-L. (2018). RIP1K contributes to neuronal and astrocytic cell death in ischemic stroke via activating autophagic-lysosomal pathway. *Neuroscience*, 371, 60-74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Nikseresht, S., Khodaghali, F., & Ahmadiani, A. (2019). Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia-reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1816-1826.
- Oberst, A., & Green, D. R. (2011). It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(11), 757.
- Ojo, O. B., Amoo, Z. A., Saliu, I. O., Olaleye, M. T., Farombi, E. O., & Akinmoladun, A. C. (2019). Neurotherapeutic potential of kolaviron on neurotransmitter dysregulation, excitotoxicity, mitochondrial electron transport chain dysfunction and redox imbalance in 2-VO brain ischemia/reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 859-872.
- Okuda, H., Nishida, K., Higashi, Y., & Nagasawa, K. (2013). NAD⁺ influx through connexin hemichannels prevents poly (ADP-ribose) polymerase-mediated astrocyte death. *Life sciences*, 92(13), 808-814.
- Orellana, J. A., Sáez, P. J., Shoji, K. F., Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., . . . Saez, J. C. (2009). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 11(2), 369-399.
- Özbal, S., Erbil, G., Koçdor, H., Tuğyan, K., Pekçetin, Ç., & Özoğul, C. (2008). The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neuroscience letters*, 438(3), 265-269.
- Özgül, C., & Nazıroglu, M. (2010). Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 27(4).
- Panchina, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology*, 10(13), R473-R474.
- Pantazi, E., Bejaoui, M., Folch-Puy, E., Adam, R., & Roselló-Catafau, J. (2016). Advances in treatment strategies for ischemia reperfusion injury. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 17(2), 169-179.
- Park, S., Yamaguchi, M., Zhou, C., Calvert, J., Tang, J., & Zhang, J. H. (2004). Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 35(10), 2412-2417.
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 15-22.
- Pina-Benabou, M. H. d., Szostak, V., Kyrozis, A., Rempe, D., Uziel, D., Urban-Maldonado, M., . . . Rozental, R. (2005). Blockade of Gap Junctions In Vivo Provides Neuroprotection After Perinatal Global Ischemia. *Stroke*, 36(10), 2232-2237. doi:doi:10.1161/01.STR.0000182239.75969.d8
- Qin, L., Guo, Y., Zhen, L., & Xinying, X. (2010). The interference of picoside II on the expressions of Caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 26(3), 342-345.
- Qu, Y., Shi, J., Tang, Y., Zhao, F., Li, S., Meng, J., . . . Mu, D. (2016). MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain. *Experimental neurology*, 279, 223-231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Rodhe, J., Burguillos, M. A., de Pablos, R. M., Kavanagh, E., Persson, A., Englund, E., . . . Joseph, B. (2016). Spatio-temporal activation of caspase-8 in myeloid cells upon ischemic stroke. *Acta neuropathologica communications*, 4(1), 92.
- Salvesen, G. S., & Walsh, C. M. (2014). *Functions of caspase 8: the identified and the mysterious*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Sandilos, J. K., Chiu, Y.-H., Chekeni, F. B., Armstrong, A. J., Walk, S. F., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2012). Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11303-11311.
- Scemes, E., & Velíšková, J. (2017). Exciting and not so exciting roles of pannexins. *Neuroscience letters*.
- Schlaug, G., Benfield, A., Baird, A., Siewert, B., Lövblad, K., Parker, R., . . . Warach, S. (1999). The ischemic penumbra: operationally defined by diffusion and perfusion MRI. *Neurology*, 53(7), 1528-1528.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- Serra, M. P., Boi, M., Poddighe, L., Melis, T., Lai, Y., Carta, G., & Quartu, M. (2019). Resveratrol Regulates BDNF, trkB, PSA-NCAM, and Arc Expression in the Rat Cerebral Cortex after Bilateral Common Carotid Artery Occlusion and Reperfusion. *Nutrients*, 11(5), 1000.
- Shabanzadeh, A., D'onofrio, P., Monnier, P., & Koeberle, P. (2015). Targeting caspase-6 and caspase-8 to promote neuronal survival following ischemic stroke. *Cell death & disease*, 6(11), e1967.
- Shan, B., Pan, H., Najafov, A., & Yuan, J. (2018). Necroptosis in development and diseases. *Genes & development*, 32(5-6), 327-340.
- Shen, H., Liu, C., Zhang, D., Yao, X., Zhang, K., Li, H., & Chen, G. (2017). Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro. *Cell death & disease*, 8(3), e2641.
- Shen, X., Venero, J. L., Joseph, B., & Burguillos, M. A. (2018). Caspases orchestrate microglia instrumental functions. *Progress in neurobiology*.
- Shestopalov, V. I., & Slepak, V. Z. (2014). Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. *Frontiers in physiology*, 5, 23.
- Shu, L., Xu, C.-q., Yan, Z.-Y., Yan, Y., Jiang, S.-Z., & Wang, Y.-R. (2019). Post-Stroke Microglia Induce Sirtuin2 Expression to Suppress the Anti-inflammatory Function of Infiltrating Regulatory T Cells. *Inflammation*, 1-12.
- Silverman, W., Locovei, S., & Dahl, G. (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(3), C761-C767.
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., . . . Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18143-18151.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Smith, C. C., & Yellon, D. M. (2011). Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(9), 1797-1806.
- Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B., . . . Spray, D. C. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*, 5(3), 193-197.
- Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G. W., Saito, A., Hayashi, T., . . . Chan, P. H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, 1(1), 17-25.
- Swanson, R. A., Ying, W., & Kauppinen, T. M. (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*, 4(2), 193-205.
- Tan, X. f., Qin, T., Li, N., Yang, Y. g., Zheng, J. h., Xie, L., & Chen, M. h. (2019). High-potassium preconditioning enhances tolerance to focal cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-apoptotic effects in male rats. *Journal of neuroscience research*.
- Taylor, K. A., Wright, J. R., & Mahaut-Smith, M. P. (2015). Regulation of Pannexin-1 channel activity. *Biochemical Society Transactions*, 43(3), 502-507.
- Thompson, R. J. (2015). Pannexin channels and ischaemia. *The Journal of physiology*, 593(16), 3463-3470.
- Toklu, H., Deniz, M., Yüksel, M., Keyer-Uysal, M., & Şener, G. (2009). The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative brain injury in rats.
- Tsuruma, K., Nakagawa, T., Morimoto, N., Minami, M., Hara, H., Uehara, T., & Nomura, Y. (2006). Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 binds to initiator procaspases and inhibits ischemia-induced apoptosis and neuronal injury. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 11397-11404.
- Unal-Cevik, I., Kılınc, M., Can, A., Gürsoy-Özdemir, Y., & Dalkara, T. (2004). Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke*, 35(9), 2189-2194.
- Upton, J. W., Kaiser, W. J., & Mocarski, E. S. (2012). DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell host & microbe*, 11(3), 290-297.
- Vandenabeele, P., Berghe, T. V., & Festjens, N. (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci. STKE*, 2006(358), pe44-pe44.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(10), 700-714.
- Vanlangenakker, N., Berghe, T. V., Bogaert, P., Laukens, B., Zobel, K., Deshayes, K., . . . Bertrand, M. (2011). cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell death and differentiation*, 18(4), 656.
- Vanlangenakker, N., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2012). Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation*, 19(1), 75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Velier, J. J., Ellison, J. A., Kikly, K. K., Spera, P. A., Barone, F. C., & Feuerstein, G. Z. (1999). Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *Journal of Neuroscience*, *19*(14), 5932-5941.
- Verzár, Z., & Szabados, S. (2011). Anesthetic Management of Aortic Aneurysm. In R. Grundmann (Ed.), *Diagnosis, Screening and Treatment of Abdominal, Thoracoabdominal and Thoracic Aortic Aneurysms*: INTECH Open Access Publisher.
- Vieira, M., Fernandes, J., Carreto, L., Anuncibay-Soto, B., Santos, M., Han, J., . . . Santos, A. (2014). Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiology of disease*, *68*, 26-36.
- Wang, Y., Reis, C., Applegate, R., Stier, G., Martin, R., & Zhang, J. H. (2015). Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per-or post-stroke. *Experimental neurology*, *272*, 26-40.
- Weber, K., Roelandt, R., Bruggeman, I., Estornes, Y., & Vandenabeele, P. (2018). Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Communications biology*, *1*(1), 6.
- Wei, L., Ying, D.-J., Cui, L., Langsdorf, J., & Yu, S. P. (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain research*, *1022*(1-2), 54-61.
- Wei, R., Wang, J., Xu, Y., Yin, B., He, F., Du, Y., . . . Luo, B. (2015). Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosomal and inflammatory damage in rats. *Neuroscience*, *301*, 168-177.
- Wen, L., Liu, L., Tong, L., Li, J., Zhang, K., Zhang, Q., & Li, C. (2019). NDRG4 prevents cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis. *Genes & Diseases*.
- Willebrords, J., Maes, M., Yanguas, S. C., & Vinken, M. (2017). Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, *180*, 144-160.
- Wu, T., Yin, F., Kong, H., & Peng, J. (2019). Germacrone attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via antioxidative and antiapoptotic mechanisms. *Journal of cellular biochemistry*.
- Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Critical reviews in oncology/hematology*, *82*(3), 249-258.
- Wu, Y., Tan, H., Huang, Q., Sun, X., Zhu, X., & Shen, H. (2011). zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF α mediated by the PKC–MAPKs–AP-1 pathway. *Cell death and differentiation*, *18*(1), 26.
- Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., . . . Shi, Y. (2013). Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure*, *21*(3), 493-499.
- Xie, Y.-L., Zhang, B., & Jing, L. (2018). MiR-125b blocks Bax/Cytochrome C/Caspase-3 apoptotic signaling pathway in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting p53. *Neurological research*, *40*(10), 828-837.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Xiong, X.-X., Gu, L.-J., Shen, J., Kang, X.-H., Zheng, Y.-Y., Yue, S.-b., & Zhu, S.-M. (2014). Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice. *Neurochemical research*, *39*(1), 216-224.
- Xu, F., Zhang, G., Yin, J., Zhang, Q., Ge, M.-y., Peng, L., . . . Li, Y. (2019). Fluoxetine mitigating late-stage cognition and neurobehavior impairment induced by cerebral ischemia reperfusion injury through inhibiting ERS-mediated neurons apoptosis in the hippocampus. *Behavioural brain research*, *370*, 111952.
- Xu, L., Guo, Z.-N., Yang, Y., Xu, J., Burchell, S. R., Tang, J., . . . Zhang, J. H. (2015). Angiotensin-like 4: A double-edged sword in atherosclerosis and ischemic stroke? *Experimental neurology*, *272*, 61-66.
- Xu, X., Chua, K.-W., Chua, C. C., Liu, C.-F., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. (2010). Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain research*, *1355*, 189-194.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, *39*(1).
- Xu, Y., Zhang, J., Ma, L., Zhao, S., Li, S., Huang, T., & Chu, Z. (2018). The pathogenesis of necroptosis-dependent signaling pathway in cerebral ischemic disease. *Behavioural neurology*, *2018*.
- Yan, H., Rao, J., Yuan, J., Gao, L., Huang, W., Zhao, L., & Ren, J. (2017). Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate ischemic neuronal death by targeting miR-21/PDCD4 signaling pathway. *Cell death & disease*, *8*(12), 3211.
- Yang, M., Lv, Y., Tian, X., Lou, J., An, R., Zhang, Q., . . . Dong, Z. (2017). Neuroprotective effect of β -caryophyllene on cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of necroptotic neuronal death and inflammation: In vivo and in vitro. *Frontiers in neuroscience*, *11*, 583.
- Yang, Q., Huang, Q., Hu, Z., & Tang, X. (2019). Potential Neuroprotective Treatment of Stroke: Targeting Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Inflammation. *Frontiers in neuroscience*, *13*, 1036.
- Yang, X.-S., Yi, T.-L., Zhang, S., Xu, Z.-W., Yu, Z.-Q., Sun, H.-T., . . . Cheng, S.-X. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury. *Scientific reports*, *7*(1), 5818.
- Yap, E., Tan, W.-L., Ng, I., & Ng, Y.-K. (2008). Combinatorial-approached neuroprotection using pan-caspase inhibitor and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor following experimental stroke in rats; is there additional benefit? *Brain research*, *1195*, 130-138.
- Yin, B., Xu, Y., Wei, R.-l., He, F., Luo, B.-y., & Wang, J.-y. (2015). Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Brain research*, *1609*, 63-71.
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., & Wallach, D. (2017). MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity*, *47*(1), 51-65. e57.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

- Yuan, J., Amin, P., & Ofengeim, D. (2019). Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 19-33.
- Zhang, F., & Chen, J. (2012). Infarct measurement in focal cerebral ischemia: TTC staining. In *Animal Models of Acute Neurological Injuries II* (pp. 93-98): Springer.
- Zhang, L., Yan, J., Liu, Y., Zhao, Q., Di, C., Chao, S., . . . Zhang, H. (2017). Contribution of caspase-independent pathway to apoptosis in malignant glioma induced by carbon ion beams. *Oncology reports*, 37(5), 2994-3000.
- Zhang, R., Tang, S., Huang, W., Liu, X., Li, G., Chi, H., . . . Tang, J. (2015). Protection of the brain following cerebral ischemia through the attenuation of PARP-1-induced neurovascular unit damage in rats. *Brain research*, 1624, 9-18.
- Zhang, W., & Meng, A. (2019). MicroRNA-124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(4), 2870-2876.
- Zhang, Y.-Y., Liu, W.-N., Li, Y.-Q., Zhang, X.-J., Yang, J., Luo, X.-J., & Peng, J. (2019). Ligustroflavone reduces necroptosis in rat brain after ischemic stroke through targeting RIPK1/RIPK3/MLKL pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1-11.
- Zhang, Z., Lei, Y., Yan, C., Mei, X., Jiang, T., Ma, Z., & Wang, Q. (2019). Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation*, 1-11.
- Zhao, W., Li, H., Hou, Y., Jin, Y., & Zhang, L. (2019). Combined Administration of Poly-ADP-Ribose Polymerase-1 and Caspase-3 Inhibitors Alleviates Neuronal Apoptosis After Spinal Cord Injury in Rats. *World neurosurgery*.
- Zhou, K. Q., Green, C. R., Bennet, L., Gunn, A. J., & Davidson, J. O. (2019). The role of connexin and pannexin channels in perinatal brain injury and inflammation. *Frontiers in physiology*, 10.
- Zhou, L., Liu, C., Wang, Z., Shen, H., Wen, Z., Chen, D., . . . Chen, G. (2018). Pannexin-1 is involved in neuronal apoptosis and degeneration in experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5684-5691. doi:10.3892/mmr.2018.8624
- Zhou, W., & Yuan, J. (2014). *Necroptosis in health and diseases*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Zhou, Y., Zhou, B., Tu, H., Tang, Y., Xu, C., Chen, Y., . . . Miao, Z. (2017). The degradation of mixed lineage kinase domain-like protein promotes neuroprotection after ischemic brain injury. *Oncotarget*, 8(40), 68393.
- Zhu, F., Zhang, W., Yang, T., & He, S.-d. (2019). Complex roles of necroptosis in cancer. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 20(5), 399-413.
- Zhu, S., Zhang, Z., Jia, L.-q., Zhan, K.-x., Wang, L.-j., Song, N., . . . Guan, L. (2019). Valproic acid attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-pyroptosis pathways. *Neurochemistry international*, 124, 141-151.
- Zivin, J. A. (1998). Factors determining the therapeutic window for stroke. *Neurology*, 50(3), 599-603.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Emine Çolak

Doğum tarihi ve yeri : 1975, Eskişehir

Uyruğu : T.C.

Medeni durumu : Evli

İletişim adresleri : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Eğitim Durumu

İlkokul : Eskişehir İbrahim Karaoğlanoğlu İlkokulu

Ortaokul : Eskişehir 19 Mayıs Ortaokulu

Lise : Eskişehir Atatürk Lisesi

Lisans : Ortadoğu Teknik Üniversitesi
Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği

Yüksek lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

Yüksek Lisans Tezi

Tez Başlığı: Karbon Tetraklorid' in (CCl₄) İndüklediği Karaciğer Hasarı ve Oksidatif Stres Üzerine *Cynara scolymus* L. Yaprağı Ekstraktının Etkileri

Tez Danışmanı: Yrd. Doç., Dr. M. Cengiz ÜSTÜNER

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Hücre Ölümü Araştırma Derneği

Yayımlar :

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Yangı Berat, Ustuner Mehmet Cengiz, Dincer Murat, Ozbayer Cansu, Tekin Neslihan, Ustuner Derya, Colak Emine, Kolac Umut Kerem, Entok Emre (2018). Propolis protects endotoxin induced acute lung and liver inflammation through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. Journal of medicinal food, 21(11), 1096-1105. DOI: 10.1089/jmf.2017.0151
2. Ustuner Derya, **Colak Emine**, Dincer Murat, Tekin Neslihan, Burukoglu Donmez Dilek, Akyuz Fahrettin, Colak Ertugrul, Kolac Umut Kerem, Entok Emre, Ustuner Mehmet Cengiz (2018). (2018). Posttreatment effects of Olea europaea L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress in rats. Journal of medicinal food, 21(9), 899-904. DOI: 10.1089/jmf.2017.0143
3. Kolac Umut Kerem, Ustuner Mehmet Cengiz, Tekin Neslihan, Ustuner Derya, **Colak, Emine**, Entok Emre (2017). The Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Salvia officinalis on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Rats. Journal of medicinal food, 20(12), 1193-1200. DOI: 10.1089/jmf.2017.0035
4. Turgut Cosan Didem, Yazıcı Huseyin Ugur, **Colak, Emine**, Soyocak Ahu, Degirmenci Irfan, Kurt Hulyam, Birdane Alparslan, Colak Ertugrul, Guneş Hasan

Veysi (2017). Susceptiveness of Vitamin K epOxide Reductase Complex Subunit 1 Gene Polymorphism in Essential Hypertension. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(5), 292-297. DOI: 10.1089/gtmb.2016.0311.

5. Turgut Cosan Didem, **Colak, Emine**, Saydam Faruk, Yazıcı Huseyin Ugur, Degirmenci Irfan, Birdane Alparslan, Colak Ertugrul, Guneş Hasan Veysi (2016). Association of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and concentration with essential hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 38(7), 602-607. DOI: 10.3109/10641963.2016.1174255.

6. **Colak Emine**, Ustuner Mehmet Cengiz, Tekin Neslihan, Colak Ertugrul, Burukoglu Dilek, Degirmenci Irfan, Gunes Hasan Veysi (2016). The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerPlus*, 5(1), 216 DOI: 10.1186/s40064-016-1894-1

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

1. Kolaç Umut Kerem, Entok Emre, Üstüner Derya, Tekin Neslihan, Özden Hilmi, Dinçer Murat, **Çolak Emine**, Üstüner Mehmet Cengiz. The Effect of *Salvia officinalis* on experimental inflammation and antioxidant system, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research, 8(1), 527, 24- 27 May, 2016

2. Turgut Cosan Didem, **Colak Emine**, Saydam Faruk, Yazıcı Huseyin Ugur, Degirmenci Irfan, Birdane Alparslan, Colak Ertugrul, Gunes Hasan Veysi. A promoter polymorphism in the Pon1 gene is associated with essential hypertension, 25th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Milano, Italy, *Journal of Hypertension*, 33, e379-e380, 12-15 June, 2015

3. Turgut Cosan Didem, **Colak Emine**, Saydam Faruk, Yazıcı Huseyin Ugur, Degirmenci Irfan, Birdane Alparslan, Gunes Hasan Veysi, Colak Ertugrul.

Decreased antioxidant paraoxonase-1 activity is associated with essential hypertension. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research, 6(1), 380, 9-12 September 2014.

4. Üstüner Mehmet Cengiz, **Çolak Emine**, Tekin Neslihan, Üstüner Derya, Çolak Ertugrul, Yangı Berat, Burukoğlu Dilek, Özbayer Cansu, Akyüz Fahrettin, Güneş Hasan Veysi, Değirmenci İrfan. The curative effects of *Olea europaea* L. leaf extract on carbon tetrachloride induced liver injury and the oxidative stress 4th. International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research 4(1), 69, 26-29 June 2012.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Özgen Merih, Turgut Coşan Didem, Atik Zeliha, Saydam Faruk, **Çolak Emine**, Soyocak Ahu, Doğaner Fulya, Berkan Funda, Değirmenci İrfan, Mutlu Fezan (2019). Evaluation of the Relationship of Paraoxonase 1 L55M and Q192R Polymorphism in Postmenopausal Osteoporosis, Osmangazi Journal of Medicine, DOI: 10.20515/otd. 534456.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Turgut Coşan Didem, Yazıcı Hüseyin Uğur, **Çolak Emine**, Değirmenci İrfan, Birdane Alparıslan, Çolak Ertuğrul, Güneş Hasan Veysi. Esansiyel hipertansiyon VKORC1 geni ile ilişkili midir?, 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye, Kongre Kitabı, 360, 27 - 30 Ekim 2015

2. Özgen Merih, Turgut Coşan Didem, Saydam Faruk, **Çolak Emine**, Soyocak Ahu, Doğaner Fulya, Taşçıoğlu Funda, Değirmenci İrfan, Mutlu Fezan, Güneş Hasan Veysi. PON1 genindeki 172T alleli osteoporoz için bir risk faktörü olabilir 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye, Kongre Kitabı, 340, 27- 30 Ekim 2015.

3. Kolaç Umut Kerem, Üstüner Mehmet Cengiz, **Çolak Emine**, Entok Emre, Dinçer Murat, Tekin Neslihan, Üstüner Derya, Özden Hilmi. *Salvia officinalis* Ekstresinin Karaciğer Antioksidan Sistemi Üzerine Etkisi, Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye, Kongre Kitabı, 292, 27- 30 Ekim 2015.

4. Turgut Coşan Didem, Ak Güntülü, **Çolak Emine**, Soyocak Ahu, Dal Aylin, Çolak Ertuğrul, Güneş Hasan Veysi, Metintaş Muzaffer. Malign mezotelyoma olgularında plazma paraoksonaz 1 enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi, 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye, Kongre Kitabı, 247, 27-30 Ekim 2015.

5. **Colak Emine**, Ustuner, Mehmet Cengiz, Tekin Neslihan, Colak Ertuğrul, Burukoglu Dilek, Degirmenci, Irfan, Gunes Hasan Veysi. Karbon tetrakloridin indüklediği karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine *Cynara Scolymus* L. yaprak ekstrasının etkileri, 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Supplement 31(6), 131, 27-30 Ekim 2011

Projeler

1. Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemi/reperfüzyon hasarında panneksin-1 proteininin apoptoz ve nekroptoz ile ilişkisi, ESOGÜ BAP, 07.05.2018- devam ediyor, Yardımcı Araştırmacı, Ulusal.
2. Demir eksikliği anemisi olan çocuklarda oksidatif stres belirteçleri, micro RNA düzeyleri ve tromboelastometri profili. ESOGÜ BAP, 21.02.2018- devam ediyor, Yardımcı Araştırmacı, Ulusal
3. *Salvia officinalis* Ekstresinin Deneysel İnflamasyon ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi, ESOGÜ BAP, 29.09.2014-19.10.2015, Araştırmacı/Uzman, Ulusal.
4. Esansiyel Hipertansiyonda Paraoksonaz Aktivitesi ve PON1 Polimorfizmleri, ESOGÜ BAP, 20.09.2013-20.09.2014, Araştırmacı/Uzman, Ulusal.

Kurs ve Sempozyumlar

1. “İyi Klinik Uygulamalar ve Temel Klinik Araştırmalar Kursu”, Kurum/Kuruluř adı: T.C. Sağlık Bakanlığı, ESOGÜ Tıp Fakóltesi ve Sürekli Eğitim ve Bilimsel Araştırmalar Derneği, 6-7 Ocak 2018, Eskişehir.
2. “BAşARILI SUNUM YAPMA TEKNİKLERİ” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi 25 Mart 2013 – 26 Mart 2013
3. “II. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu”, Hücre Ölümü Araştırma Derneği, 1-2 Kasım 2012, Eskişehir.
4. “Kök Hücre ve Gen Tedavisi Sempozyumu”, Uludaę Üniversitesi Veteriner Fakóltesi, 27 şubat 2012, Bursa.
5. “Deney Hayvanları Kullanımı ile ilgili Eğitim Programı”, ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 20 Eylül- 1 Ekim 2010, Eskişehir.