T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SOLÜT TAŞIYICILARIN BEYİN HASARI FARMAKOTERAPİSİNDEKİ ROLÜ

ESRA YALÇIN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2017

TEŞEKKÜR

Bu çalışma sırasında bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana rehberlik eden; öğrencisi olma ayrıcalığını yaşatan, beyin fırtınası yaparak karılaştığım problemlerin sonucuna ulaşmamı sağlayan, devam etmek için desteğe ihtiyaç duyduğum zamanlarda yanımda olan ve her şeyden önemlisi bir bilim insanı olarak yetişmemi sağlayan Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

REMER ailesinin bir üyesi olma şansı tanıdığı, sadece bilimsel değil manevi anlamda da bir büyüğe ihtiyaç duyduğumda beni tecrübelerinden mahrum bırakmadığı için Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Prof Dr Ülkan Kılıç, Prof Dr Bayram Yılmaz, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ozansoy'a da bu çalışmanın devam edebilmesi için sağladıkları destekten ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca tecrübelerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen, pes ettiğimde hem bir bilim adamı hem de bir takım arkadaşı olarak yanımda bulunan Ahmet Burak Çağlayan ve Mustafa Çağlar Beker'e hususi teşekkürlerimi sunarım. Özellikle her şeyin aksi gittiği umutsuz anlarda onların destek ve motivasyonları olmadan ilerlemem mümkün olmazdı. Takım arkadaşı olmakla beraber abi olarak gördüğüm Taha Keleştemur'a, iyimserliğini hiçbir zaman kaybetmeyen ve proteomiks laboratuvarında kritik düşünce aklını kazanmamı sağlayan Şeyma Türkseven'e, ve Kılıç laboratuvarının diğer kıymetli üyeleri Berrak Çağlayan, Elif Sertel, Aysun Dilden, Serdar Altunay, Reyda Karaçay ve Arman Dalay'a paylaştıkları neşeli çalışma ortamı ve sağlamış oldukları destek için teşekkür ederim.

İstanbul Medipol Üniversitesi ve REMER ailesinin diğer üyelerine, her türlü teknik desteği sağlayan ve selamlarını eksik etmeyen Hilmi Kaan Alkan'a, karşılaştığımız sorunlara sürekli çözüm üreten MEDİTAM üyeleri Ekrem Musa Özdemir ve Ali Şenbahçe'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisanstan sonra doktora yolculuğuna da beraber çıktığımız ve her an yanımda olduğunu hissettiğim Büşra Gürel'e; kendi alanı olmamasına rağmen tüm hipotezlerimi ve çalışmalarımı merakla dinleyerek hevesimin canlı kalmasını sağlayan, her zaman her şeyin en iyisini layık görerek en büyük desteği veren Eda Dinçer'e varlıklarından dolayı duyduğum minneti ifade etmek isterim.

Son olarak emek ve çabaları ile bugüne gelmemi sağlayan değerli aileme; bilim insanı olacağıma her daim inanan ebeveynlerime, bilimsel anlamda ufkumun genişlemesi için oluşturduğu tartışma ortamları ile verdiği kıymeti sürekli hissettiren dayım Dr. Mehmet Baki Doğan'a, karşılaştığım zorluklarda hep arkamda bulduğum ve her birini sitem etmeksizin benimle paylaşan diğer yarım, kız kardeşim Aliye Yalçın'a en derin teşekkürlerimi iletmek isterim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI i
BEYAN ii
TEŞEKKÜR iii
KISALTMALARIN LİSTESİ ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi
TABLOLARIN LİSTESİ xii
1- ÖZET 1
2- ABSTRACT 2
3- GİRİŞ VE AMAÇ 3
4- GENEL BİLGİLER 6
4.1 Felci, Etkileri ve Oluşma Şekilleri 6
4.2 Beyin Felci Patofizyolojisi 6
4.2.1. Ekzitotoksisite ve peri- infarct depolarizasyon 7
4.2.2. Ödem oluşumu, nekroz ve apoptoz 8
4.2.3. Anjiyogenez 9
4.2.4. Enflamasyon 9
4.3 Beyin Felci Tedavi Yaklaşımları 10
4.3.1. Anti enflamatuvar etkili ajanlar 10
4.3.1.1. Statinler 10
4.3.1.1.1 Simavastatin 10
4.3.1.1.2 Atorvastatin 11
4.3.1.1.3 Rozuvastatin 11
4.3.1.1.4 Anjiotensin II dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin II blokörleri 11
4.3.2. Nöroprotektif ajanlar 12
4.3.3. Beyin farmakoterapisi 12
4.3.4. Kan beyin bariyeri fizyoloji ve anatomisi 13
4.3.4.1. Endotelyal hücreler 13
4.3.4.1.1 SLCO ailesi ve Oatp1a5 14
4.3.4.2. Nörovasküler üniteyi oluşturan diğer yapılar 15

5- MATERYAL METOT 17
5.1 Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO) 17
5.2 Hayvanların Sakrifiye Edilmesi 19
5.3 Histolojik Değerlendirmeler İçin Kesitlerin Alınması 19
5.4 Cresyl Violet Boyaması 19
5.5 DNA Kırıklarının Analizi 20
5.6 Beyin Kapiler Zenginleştirme Yöntemi ile Mikro Damar Parçacıklarının Eldesi 20
5.7 Protein Çalışmaları 21
5.7.1. Protein izolasyonu 21
5.7.2. Protein konsantrasyonu ölçümü ve blotların hazırlanması 21
5.7.3. Western Blot 22
5.7.4. Stripleme 23
5.7.5. Değerlendirme 23
5.8 İmmünflorasan Boyamalar 23
5.9 mRNA Analizleri 24
5.9.1. RNA izolasyonu 24
5.9.2. cDNA sentezi 25
5.9.3. Gerçek zamanlı PZR ve analizi 26
5.9.4. Analiz 27
5.10 İlaç Ölçüm Analizleri 28
5.10.1. Enjeksiyonların yapılması ve dokuların temini 28
5.10.2. Örneklerin analize hazırlanması 28
5.10.2.1. Serum örneklerinin analize hazırlanması 28
5.10.2.2. Striatum dokusu örneklerinin analize hazırlanması 29
5.11 İstatistiksel Değerlendirme 29
6- BULGULAR 30
6.1 TQ-S Cihazı ile Serum ve Dokudan Rozuvastatin Tayini 30
6.2 Oatp1a5'in Beyin Mikro Damar Parçacıklarında Anlatımı 32
6.3 İskemik Striatumda İmmünflorasan Boyamalar 34
6.3.1. Oatp1a5- GFAP ikili boyaması 35
6.3.2. Oatp1a5- Iba-1 ikili boyaması 38

6.3.3. Oatp1a5- NeuN ikili boyaması 41
6.3.4. Oatp1a5- MAP2 ikili boyaması 43
6.3.5. Oatp1a5- CD31 ikili boyaması 45
6.4 Nöronal Sağ Kalımın Değerlendirilmesi 47
6.5 DNA Kırıklarının Değerlendirilmesi 49
6.6 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi 51
6.6.1. p-JNK proteini Western blot değerlendirmesi 53
6.6.2. p-p21 proteini Western blot değerlendirmesi 55
6.6.3. p-p38 proteini Western blot değerlendirmesi 56
6.6.4. Bax proteini Western blot değerlendirmesi 56
6.6.5. Bcl_xL proteini Western blot değerlendirmesi 58
6.6.6. Aktif kazpaz-1 proteini Western blot değerlendirmesi 59
6.6.7. Aktif kazpaz-3 proteini Western blot değerlendirmesi 61
6.6.8. Aktif kazpaz-8 proteini Western blot değerlendirmesi 63
6.6.9. Aktif kazpaz-9 proteini Western blot değerlendirmesi 64
6.7 mRNA Analizleri ile Enflamasyon ve Damarlaşmayla İlgili Genlerin Anlatım Analizi 65
6.7.1. IL-1 beta'nın mRNA analizi 66
6.7.2. TNF alfa 'nın mRNA analizi 67
6.6.3. TGF beta 'nın mRNA analizi 68
6.6.4. VEGF-A 'nın mRNA analizi 69
6.6.5. VEGF-B 'nin mRNA analizi 70
6.6.6. MMP 9'un mRNA analizi 71
7- TARTIŞMA ve SONUÇ 72
8- KAYNAKLAR 78
9- ETİK KURUL ONAYI 86
10- ÖZGEÇMİŞ 87

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABC	ATP Binding Casette
ABCB1	ATP Binding Casette B1
ABCC1	ATP Binding Casette C1
AMPA	a-amino-3-hidroksi-5-methil-4-izoksazolepropionik asit
ATP	Adenozin üç fosfat
BBB	Blood Brain Barrier
CRP	C reaktif protein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Di- Metil Sülf-Oksit
DNA	Deoksiribo Nukleik Asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
Glu	Glutatyon
HEPES	-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etanesulfonik asit
HIF	Hipoksi İndüklenebilir Faktör
iNOS	Indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
IL1β	Interlökin 1 beta
IL 6	Interlökin 6
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDF	Lazer Doppler Kan Akımı
MAP 2	Microtubule İlişkili Protein 2
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MCP-1	Monosit Kemoatraktant Protein-1
MMP-9	Matriks Metallo Proteinaz 9
MSS	Merkezi Sini Sistemi
NeuN	Nöronal Nukleus
NFκB	Nukleer Faktör Kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PFA	Para Form Aldehit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nukleik Asit
ROS	Rozuvastatin
SLC	Solüt Taşıyıcı
TBS-T	Tamponlanmış Tris- Tuz Çözeltisi
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
t-PA	Doku plazminojen aktivatörü
VCAM	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
OSAO	Orta Serebral Arter Oklüzyonu

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 6.1.1. Striatum dokusunda ilaç birikimi tayini 31
Şekil 6.2.1. Grubu operasyon geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı 32
Şekil 6.2.2. Oatp1a5'in mikro damar parçacıklarında zamana bağlı anlatımı 33
Şekil 6.3.1.1. İskemik striatumda GFAP/Oatp1a5 boyaması 35
Şekil 6.3.1.2. Primer kortikal nöron kültürlerinde GFAP/Oatp1a5 boyaması 36
Şekil 6.3.1.3. Primer kortikal glia kültürlerinde GFAP/Oatp1a5 boyaması 37
Şekil 6.3.2.1. İskemik striatumda Iba-1/Oatp1a5 boyaması 39
Şekil 6.3.2.2. Primer kortikal glia kültürlerinde Iba-1/Oatp1a5 boyaması 40
Şekil 6.3.3.1. İskemik striatumda NeuN/Oatp1a5 boyaması 41
Şekil 6.3.3.2. Primer kortikal nöron kültürlerinde GFAP/NeuN boyaması 42
Şekil 6.3.4.1. Primer kortikal nöron kültürlerinde MAP2/Oatp1a5 boyaması 44
Şekil 6.3.1.1. İskemik striatumda CD31/Oatp1a5 boyaması 45
Şekil 6.4.1. B grubu Seri 1 operasyonları geçiren hayvanların nöronal sağ kalım analizleri 47
Şekil 6.5.1. B grubu Seri 1 operasyonları geçiren hayvanların DNA kırıkları analizleri 49
Şekil 6.6.1. B Grubu seri 2 operasyon geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı 51
Şekil 6.6.1.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-1 proteini Western blot analizleri 54
Şekil 6.6.2.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-3 proteini Western blot analizleri 55
Şekil 6.6.3.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-8 proteini Western blot analizleri 56
Şekil 6.6.4.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-9 proteini Western blot analizleri 57
Şekil 6.6.5.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların Bax proteini Western blot analizleri 58
Şekil 6.6.6.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların Bcl- xL proteini Western blot analizleri 59

Şekil 6.6.7.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-JNK proteini Western blot analizleri 62
Şekil 6.6.8.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-p21 proteini Western blot analizleri 63
Şekil 6.6.9.1. B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-p38 proteini Western blot analizleri 64
Şekil 6.7.1. B Grubu seri 3 operasyon geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı 65
Şekil 6.7.1.1. IL1 betanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 66
Şekil 6.7.2.1. TNF alfanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 67
Şekil 6.7.3.1. TGF betanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 68
Şekil 6.7.4.1. VEGF-A'nın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 69
Şekil 6.7.5.1. VEGF-B'nin iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 70
Şekil 6.7.6.1. MMP 9'un iskemik dokudaki gen anlatımının analizi 71

TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 5.9.2.1. cDNA sentezi için hazırlanan ana karışım içerikleri 27
Tablo 5.9.3.1. Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan ana karışım içerikleri 28
Tablo 5.9.3.2. Gerçek zamanlı PZR'de kullanılan primer çiftleri dizileri 29

1. ÖZET

SOLÜT TAŞIYICILARIN BEYİN HASARI FARMAKOTERAPİSİNDEKİ ROLÜ

İlaç birikimi olarak ifade edilen farmasötik ajanların beyine girişi ve belirli konsantrasyon seviyelerine ulaşmaları, hem pasif hem de kan beyin bariyeri (KBB) boyunca bulunan aktif taşıyıcılar tarafından düzenlenen bir süreçtir. Bu çalışmada çözünen taşıyıcı SLCO ailesinde sınıflandırılan, farklı dokularla birlikte KBB boyunca da anlatımı yapılan ve substratlarını KBB'den beyin parankimine pompalayan Oatp1a5 taşıyıcılarının beyin felci sonrasındaki ifadesindeki değişiklikler ve ilaç tedavisindeki rolü incelenmiştir. Bu amaçla Oatp1a5 iskemik beyinde glutatyon ile baskılanmış, nöroprotektif substratı olan rosuvastatinin birikimi ve etkinliği üzerine etkileri araştırılmıştır. 30 dakikalık beyin felci sonrası hayvanlar iki farklı sete bölünmüştür. İlk sette Oatp1a5'in mikrodamar parçacıklarındaki anlatımındaki değişiklikler beyin felci sonrası farklı reperfüzyon sürelerinde (12, 24 ve 72 saat) incelenmiştir. İkinci sette Oatp1a5'in farmakolojik olarak baskılanması sonrası hücresel hayatta kalım Cresyl violet boyaması, iskemik sitriatumdaki apoptotik hücre sayısı TUNEL boyaması, apoptotik proteinlerin anlatımları Western blot yöntemi ile; beyin dokusundaki pro- ve anti- enflamatuvar cevap ile vaskülasrizasyona ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile bakılmıştır. Oatp1a5'in hücreye özgü lokasyonunun belirlenmesi için ikili immün florasan boyamalar yapılmıştır. Ayrıca Oatp1a5'in inhibisyonunun rosuvastatinin beyinde birikimi üzerine olan etkisinin belirlenmesi için kan ve beyin parankiminde kantitatif ölçümler yapılmıştır. Elde edilen bulgular Oatp1a5'in baskılanmasının beyin parankiminde rozuvastatin birikimini engellediği ve rozuvastatinin hücresel sağ kalım, apoptoz ve damarlaşma üzerindeki iyileştirici etkilerini geri çevirdiğini göstermiştir. Oatp1a5'in yalnızca endotel hücrelerde değil, kortikal nöronlarda da anlatımının yapıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular solüt taşıyıcıların rolünün beyin felcinde ilk defa çalışılmasının yanında Oatp1a5'in substratı olarak geliştirilebilecek koruyucu moleküllerin beyne iletimlerini sağlayarak beyin felcinin klinik tedavisinde gelecek vadeden bir taşıyıcı olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: SLC, serebral iskemi, beyin farmakoterapisi

Bu tez TÜBİTAK 115S471 nolu proje kapsamında yapılmıştır.

2. ABSTRACT

ROLE OF SOLUTE CARRIERS IN BRAIN INJURY PHARMACOTHERAPY

The delivery of pharmaceutical agents to brain and achievement at certain level of concentration within it is expressed as drug accumulation. This term includes not only passive processes but also the ones regulated by active transporters that are expressed through endothelial cells of blood brain barrier (BBB). In the present project, it was aimed to characterize expression profile and role of Oatp1a5 in drug treatment after ischemic stroke. The transporter has been previously been shown to be expressed along the BBB -as well as in several other tissues- and is able to pump drugs into cells. For this purpose the activity of Oatp1a5 was inhibitied by glutathione and the outcome was investigated through the accumulation and the effeciancy of one of it's known neuroprotective substrates; rosuvastatin. Animals were divided into two sets following induction of 30 min cerebral artery occlusion (MCAo). Changes in Oatp1a5 level in brain micorvessels following MCAo with different reperfusion times (12, 24 and 72 hrs) was investigated wtihin the first set. The second set it was aimed to test how Oatp1a5 inhibition influences the accumulation and efficacy of rosuvastatin in the ischemic brain. Evalution of cellular survival by Cresyl violet staining, number of apoptotic cells within ischemic stiraum by TUNEL, expresison of apoptottic proteins by Western blot, vascularization at neuronal tissue by real time PCR. The results have demonstrated that inhibition of Oatp1a5 prevented the accumulation of rosuvastatin within the brain paranchyma and reversed rosuvastatin's ameliorating effects on cellular survival, apoptosis and vascularization. Moreover Oatp1a5 was found to be located not only in endothelilal cells of the brain capillary but also in cortical neurons. Besides examining the role of Oatp1a5 in ischemic stroke fort he first time, the study hopes to identify new targets the knowledge of which might potently improve drug developments for stroke.

Keywords: SLC, cerebral ischemia, brain pharmacotherapy.

This thesis is funded by TUBITAK 115S471 project.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

SLC süper-aileleri, geniş çapta çeşitlilik gösteren ve besinleri, toksinleri, sinyal moleküllerini, nörotransmitterleri, endo ve zenobiyotik bileşenleri de içeren substratlarının trans-epitelyal hareketlerinin kontrolünden sorumludur (1). SLC taşıyıcı polipeptidleri substratlarını KBB'den beyne doğru taşımaktadırlar (2, 3). Süper-ailelerden biri olan ve organik anyon taşıyıcı polipeptidler (Oatps) olarak da adlandırılan SLCO süper-ailesinin üyeleri insanda ve kemirgende tanımlanmış olup filogenetik sınıflandırmaları yapılmıştır (4). Bu taşıyıcı polipeptidlerin anlatımları vücuttaki tüm epitel hücrelerde gerçekleşmekle beraber bazıları dokuya özgünlük gösterebilmektedir. Bunlardan çalışmamızın konusu olan Oatp1a5 ince bağırsak, göz ve beyinde epitel hücrelerin apikal yüzünde bulunmaktadır (5). Literatürde Oatp1a5'e ait çalışmalar özellikte son 5 yılda artmıştır. Yayınlanan çalışmalar temel olarak bağırsakta ve gastrointestinal dokulardaki anlatımları ve ilaçların emilimindeki rolleri ile ilgilidir (6-9). Nörolojik rahatsızlıkların farmakoterapisi açısından potansiyel önem taşıdığı bu kaynaklarda vurgulanan SLCO süper ailesine ait serebral hastalıklar hakkında sadece birbirine çok yakın iki yayın bulunmaktadır (5, 10). Mevcut çalışmaları gerçekleştiren yazarların bir diğer makalelerinde de belirttikleri gibi serebral hipoksiden kaynaklı merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde yeni terapötiklerin beyne iletilmesi çalışmalarında en uygun model serebral iskemi modelidir (5). Literatürde Oatp1a5'in karakterizasyonun bu modelde henüz çalışılmamış olması nedeniyle bu çalışmada solüt taşıyıcıların beyin felci farmakoterapisindeki görevlerini mekanizmaları ile birlikte açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

Diğer yandan literatürde (HMG-KoA) reduktaz inhibitörü provastatinin Oatp1a5'in substratı olduğu belirtilen bir çalışma bulunmaktadır (6). Bu çalışmada provastatinin bağırsaktaki emiliminin önemli ölçüde Oatp1a5 taşıyıcı polipeptidi üzerinden gerçekleştiği ratlarda Oatp1a5'in inhibitörü narginin kullanılarak gösterilmiştir. Redüktaz inhibitörleri, lipid seviyesini düşürücü özelliklerinin yanı sıra serbest radikal yakalayıcısı olarak davranarak nörokoruyucu/antioksidan özellik gösterdikleri ve ayrıca anjiyogenez ve nörogenez gibi nörorejeneratif süreçlerde de rol

aldıkları için beyin felcinin ikincil önlenmesi sürecinde önem kazanmaktadırlar (11-13). Grubumuz etkin bir (HMG-KoA) redüktaz inhibitörü olan rosuvastatinin farelerde beyin felcinin akut süreci sonrasında uygulanmasının kontralezyonal motor kortikal plastisiteyi arttırdığını göstermiş, ayrıca rosuvastatin uygulamasının perilezyonal doku yeniden modellenmesi üzerinde de teşvik edici etki gösterdiğini ispatlamıştır (14). Bununla birlikte rosuvastatinin Oatp1a5'in substratı olduğu bilgisi de göz önünde bulundurulduğunda Oatp1a5'in aynı zamanda beyin felcinin patolojik süreçlerindeki rolünün tanımlanmasını tedavi sürecine farklı yaklaşımlar kazandırması açısından önemli görmekteyiz.

Bu tez çalışmasının amacı, SLCO ailesine ait taşıyıcı polipeptidin iskemi sonrası nöro koruyucu rollerini karakterize etmektir. Bu amaçla, Oatp1a5'in modülasyonunun beyni hedef alan ilaçların birikiminde ilerlemeye ve etkinliklerinin artmasına izin verip vermeyeceği araştırılmıştır. Mevcut farmasötik bileşiklerin feksofenadin, indometasin, ouabain, rokuronyum, enalapril, temokaprilat, rosuvastatin, pitavastatin, benzilpenisilin, rifampisin levofloksasin, metotreksat, imatinib, sakuinavir gibi sayıca büyük bir kısmı SLCO taşıyıcılarının substratlarını oluşturduklarından, bu taşıyıcıların ilaçlar ile etkileşim mekanizmalarını anlamak daha etkili farmakolojik bileşenler geliştirmek açısından esas teşkil etmektedir (15-17).

Elde edilen bulgular aynı zamanda ilaç direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına ve bu çerçevede bireysel tıp açısından taşıyıcı inhibitörlerini de içeren yeni kombinasyon tedavileri açısından da önem taşımaktadır.

Proje kapsamında,

(a) Oatp1a5'in 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması ve farklı reperfüzyon (sırasıyla 12, 24, 72 saat) süreleri sonrası anlatımlarını immünohistokimya ve Western blot teknikleri ile protein düzeyinde analiz etmek.

(b) Oatp1a5 baskılanmasının, nöroprotektif olarak tanımlanan Oatp1a5 substrat bileşeni rosuvastatinin iskemik ve iskemik olmayan beyinde birikimleri üzerine etkisini araştırmak.

(c) Oatp1a5'in farmakolojik olarak baskılanmasının rosuvastatinin noröprotektif aktivitesi üzerinden serebral kan akımının onarılması, pro- ve anti enflamatuvar cevabın oluşması ile ilgili genlerin nasıl etkilendikleri üzerinde çalışmak hedeflenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beyin Felci, Etkileri ve Oluşma Şekilleri

Beyin felci veya inme, bireyin engelli bir yaşama bağlı kılan en yaygın sebeplerin içerisinde ilk sırada olmakla birlikte, demansın ikinci, dünyada gerçekleşen ölümlerin ise üçüncü önde gelen nedenidir (18). Hastalık sonrası hayatın sürdürülebilmesi için yardım ve bakıma ihtiyaç duyulması, bireyin hayatına yansıyan olumsuz etkileri başta klinik, sosyal ve ekonomik olmak üzere bir çok alanı doğrudan etkilemektedir. Buna karşın, hasar oluşmasına ve yayılmasına neden olan patofizyolojik mekanizmalar günümüzde hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durumun bir sonucu olarak beyin felcinin gelişmesini önleyecek nitelikte uygun önlemlerin alınabilmesi ve başarılı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi de günümüzde henüz yeterli seviyeye ulaşamamıştır. Mevcut olan tek müdahale yöntemi eğer hasta ilk 4 saatte hastaneye ulaştırılabilirse doku plazminojen aktivatörü (t-PA) kullanımı veya trombolizisin de inme geçiren hastaların %5'inden az bir kısmına ulaştırılabildiği göz önünde bulundurulduğunda, beyin felci patofizyolojisi üzerinde yapılacak çalışmalara olan ihtiyaç daha net bir şekilde kendini göstermektedir (19).

Serebrovaskuler bir rahatsızlık olarak tanımlanan beyin felci bir kaç farklı şekilde ortaya çıkabilmektedir. Geniş damarlar ve küçük damar tiplerinde görülen trombolitik vakalar, kardiyak ve arteriyal faktörlerlerin varlığında gerçekleşen durumlar beyin felci oluşmasına sebep olan faktörlerden bir kaçıdır. Bunun dışında inme vakaları sistemik hipoperfüzyon kaynaklı olabilir. Son olarak venöz tromboz vakaları da inme ile sonuçlanabilmektedir. Sonuç olarak, akut inme vakalarında beyne iletilen besin ve oksijenin yetersiz kalması nedeni ile hasar gelişmektedir (20).

4.2. Beyin Felci Patofizyolojisi

Kalıcı veya geçici inme, oluşumunu takiben zaman içerisinde etkilenen alan olarak yayılarak büyüyen ve daha geniş alanları etkileyen patolojik süreçlerden kaynaklı bir hasar oluşum şeklini ifade eder. Süreç içerisinde besin ve oksijen yetersizliğinden kaynaklı olarak başta adenozin tri fosfat (ATP) olmak üzere yüksek enerjili fosforlu

bileşenlerin üretimi yeterli miktarda gerçekleşmez. Dolayısı ile hayatta kalmak için gerekli ve enerjiye bağlı olan hücresel süreçler sekteye uğrayarak hücresel ölüme, nihai aşamada ise doku hasarına neden olmaktadırlar. Etkilenme süresi ve gerçekleştiği bölgeye göre oluşan hasardan etkilenen alan farklılık göstermekle beraber iyon gradiyentlerinin enerji gerektiren süreçlerle sürekli dengelendiği nöronlar, nöral dokunun hasara en açık hücre tipidir (21).

4.2.1 Ekzitotoksisite ve peri- infarct depolarizasyon

Beyni besleyen damarlardan birinin tıkanması sonucunda gelişen temel patolojik durumlar başlıca; aşırı uyarandan kaynaklı toksisite, per-infarkt depolarizasyon, apoptoz ve enflamasyon olarak seyretmektedir (22). Beyne oksijen ve besin kaynağının ulaştırılamadığı durumlarda, tıkanan damara komşu nöronlar membran potansiyellerini kaybederek depolarize olabilmektedirler. Depolarizasyonu takiben somato dendritik ve presinaptik voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları aktif hale gelerek glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin sinaptik aralık ve hücreler arası boşluğa salınmasına neden olmaktadır. Bu sırada post sinaptik hücre de aynı şekilde damar tıkanıklığından kaynaklı besin ve oksijen eksikliğinden dolayı enerji yetersizliği yaşamakta ve sinapslara salınan uyarıcı nitelikteki nörotransmitterlerin ortadan kaldırılması mümkün olmamaktadır. Sinapslarda oluşan nörotransmitter birikimi sürekli olarak liganda bağlı reseptör aktivasyonuna neden olarak eksitotoksisite denilen sürekli uyarılmadan kaynaklı olarak gelişen patolojik bir süreci başlatmış olur. Eksitotoksisite sırasında sürekli uyarılan reseptörler (başlıca kainat/AMPA ve NMDA reseptröleri) hücreye Ca^{2+}, Na^{+} ve K^{+} geçişlerini kontrol etmektedirler. Bunun yanı sıra, hücre içinde fosfolipaz c ve fosfatidil inositol 3 fosfat yolağı üzerinden endoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} kanallarının açılmasına sebep olarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun daha da artmasına neden olmaktadır (23). Artan seviyesi akson terminalinden bir sonraki nöronla kurulmuş olan sinapsa yeni nörotransmitterlerin salınımına neden olmaktadır. Hasarın merkez bölgesinde etkilenen bir nöronla başlayarak bu şekilde diğer nöronları de etkileyen süreç peri-infark depolarizasyon olarak da tanımlanmaktadır.

4.2.2. Ödem oluşumu, nekroz ve apoptoz

Merkez bölgede daha erken başlayan nörotransmitterlerin fazla miktarlarda gerçekleşen aktiviteleri sonucu hücreye giren Na^+ ve Cl^- bir süre sonra hücre içerisindeki ozmotik basıncın artışına ve dokuyu beyinde ödem oluşumu ile sonlanacak nekrotik hücre ölümüne taşımaktadırlar (22). Oluşan ödemin büyüklüğü, beyin felci geçiren hastanın ne kadar yaşayacağını belirleyen en önemli faktörler arasındadır. Henüz hasarın geri dönülmez nekrotik ölüme kadar ilerlemediği fakat peri infark depolarizasyonun yayılmaya başladığı penumbrada ise hücre içersinde artan Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik hücre ölüm yolakları aktif olmaya başlamaktadır. Ca^{2+} iyonunun hücre içi konsantrasyonundaki artış hücrede serbest radikal oluşumunu etkileyerek mitokondriyal hasara neden olmaktadır. Serbest radikallerin aktivitesi ile okside olan mitokondriyal proteinler mitokondriden sitokrom c salınımını tetiklemektedir. Sitokrom c seviyesindeki artış hücreyi apoptoza götürecek kaspaz proteinleri aktiviteleri ile düzenlenen sinyal yolaklarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu şekilde gelişen apoptotik süreçler ekstrinsik yolak olarak adlandırılmaktadır. Diğer yandan iskemik hasar, Bcl-2 ve p53 gibi erken dönem apoptotik proteinlerinin gen anlatımlarına ve protein seviyelerine arttırıcı yönde etki etmektedir. Bu proteinler yine mitokondriden (sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör gibi) pro-apoptotik moleküllerin salınımına neden olarak erken dönemde apoptozun intrinsik ayağını yönetmektedirler (22, 24, 25). Ca^{2+} konsantrasyonunun hücre içi ve dışındaki artışı, etkilerini hücre iskeleti ve hücre dışı matriks proteinlerinin yıkımı üzerinden de göstermektedir (23).

İskemi aynı zamanda toplu hücre ölümü ile sonlanan bir takım diğer hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonundan da sorumludur. Bunlar içerisinden en yaygın olarak aktive olan yolaklar MAPK ailesine ait JNK (26) ve p38 (27) ile hücre döngüsünü kontrol eden siklin bağımlı kinazlar ile p21'dir (28).

İnmenin patofizyolojisinin doğası gereği nöronal hücrelerin apoptoz veya nekroza gitmesi hasar bölgesinde homojen olarak gerçekleşmeyip, merkezden başlayan ve çevreye yayılan bir davranış sergilemektedir. Beyin felcindeki tedabi çalışmalarında

kurtarılmak istenen hedef bölge merkez olmayıp, hasarın yayıldığı bölge olan penumbraya odaklanılmaktadır.

4.2.3. Anjiyogenez

Beyin felcinin etkilediği dokunun penumbra bölgesinde anjiogenez süreci gerçekleşmektedir. Temel olarak iki farklı yoldan kontrol edilen anjiyogenezin boyutu, hastanın hayatta kalım süresi ile doğrudan ilişkilidir. İlk mekanizmada hipoksi indüklenebilir faktör -1 (HIF-1) anjiyogenez ile ilgili sinyal yolaklarının temel ateşleyicisi olarak görülmektedir. Hipoksi ile yıkımı azalan HIF-1, anjiyogenez için esas olan vasküler endotel büyüme faktörlerini (VEGF) aktive eder. Bunlardan VEGF-A hem kan damarları hem de lenfatik damarların oluşumunu teşvik ederek damar morfogenezinin düzenlenmesinde baskın olarak rol alır. VEGF-B ise kan damarlarının oluşumundan sorumlu bir büyüme faktörü olup, aynı zamanda VEGF-A nın aktive ettiği sinyal yolaklarında destekleyici olarak da görev almaktadır (29).

4.2.4. Enflamasyon

Nekrotik ve apoptotik hücre ölümü, ödem oluşumu, eksitotoksisite ve peri-infark depolarizasyonun yanı sıra iskemik dokuda meydana gelen patofizyolojik süreçlerden bir diğerini de enflamatuvar reaksiyonlar oluşturmaktadır. Bu reaksiyonların başında, nöral, astrosit, mikroglial ve endotelyal hücrelerin tamamından iskeminin oluşmasına bir yanıt olarak sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir. Nükleer faktör kappa- B (NFκB), IL-1β ve TNF-α , IL-6 başta olmak üzere iskemi sonrası miktarlarında artış görünen sitokinlerin genel transkripsiyon faktörüdür. Periferde kan dokusunda bulunan eritorsit ve lenfositler dışındaki tüm hücreler tarafından anlatımı gerçekleştirilen NFκB'nin, MSS hasarlarını takiben anlatımı mikroglial hücreler tarafından gerçekleştirilir. İskemi başlangıcı ile birlikte miktarlarında anlamlı ölçüde artış görülen yaygın sitokinler IL-1β ve TNF-α nın her ikisi de kademeli olarak hasarın merkez bölgesine lökositlerin birikimi, aktivasyonu ve serebral mikrovasküler tabakaya tutunmalarını sağlamaktadırlar. Sitokin stimülasyonu ile aktive olan lökositler, aktive ettikleri monosit

ve makrofajlarla birlikte hasarın merkezine komşu vasküler bölgeden nöral dokuya göç eder ve enflamatuvar cevap oluşturmak, hücre farklılaşması veya hücresel ölüm gibi süreçleri yönlendirme yolu ile MSS'inde hasarın yayılmasına katkıda bulunurlar (30, 31).

4.3. Beyin Felci Tedavi Yaklaşımları

Daha önce bahsedildiği üzere, en yaygın tedavisinin günümüzde t-PA uygulaması olan beyin felci vakalarında reperfüzyon hasarı göz önünde bulundurulduğunda t-PA uygulanabilecek hasta profillerinin de sıkı bir taramadan geçirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple akut müdahaleler ve hasarın yayılmasına yönelik geliştirilen stratejiler vaksüler risk faktörlerinin modülasyonu çerçevesinde sınırlı kalmıştır. Tedbir amaçlı uygulanan tedaviler de hipertansiyon, diyabet, atriyal fibrilasyon, fiziksel inaktivite, karotid stenoz gibi hastalıkları taşıyan bireylere; antiplatelet, tansiyon düşürücüler, lipid/kolesterol düşürücü ilaçlar ve antikoagülanlar ile destek sağlanmaktadır (31-33). Bununla birlikte son dönemlerde yapılan araştırmalar ile geliştirilen yöntemler yeni tedavi yaklaşımlarının doğmasına ışık tutmaktadır.

4.3.1. Anti enflamatuvar etkili ajanlar

4.3.1.1. Statinler

Koroner arter rahatsızlığına sahip bireylere lipid/ kolesterol düşürücü ilaç olarak verilen statinlerin serum kolesterol seviyesindeki anlamlı ölçüde düşüşün yanı sıra C reaktif protein (CRP) nin de serum miktarının azalmasına neden olmaktadır (34, 35). CRP seviyesini düşürmesi statin grubu ilaç moleküllerine anti enflamatuvar özellik kazandırmaktadır.

4.3.1.1.1. Simavastatin

Simavastatinin nörokoruyucu etkileri kemirgenlerle yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Beyin felci sonrası uygulandığında infarkt hacmini düşürdüğümü ve serebral kan damarlarında eNOS sentezini arttırdığı gösterilmiştir (36, 37).

4.3.1.1.2. Atorvastatin

Nöron özellikleri çalışılmış diğer bir statin grubu, NFκB protein seviyesini düşünerek iskemi sonrası enflamasyonun baskılanmasına katkıda bulunan atorvastatindir (38). Ayn zamanda smavastatine benzer şekilde hasar alanında küçülmeye, eNOS mRNA seviyesinde artışa neden olduğu da bilinmektedir (39). Ayrıca atorvastatinin beyni felci sonrasında bütünlüğü bozulan kan beyin bariyeri (KBB)'nde bozulmanın derecesini düşürdüğü de gözlenmiştir. Bu bağlamda nöronal dokuya periferden lökosit göçünü engelleyerek enflamasyonun şiddetlenmesini başka bir açıdan da engellemektedir (40).

4.3.1.1.3. Rosuvastatin

Diğer statinler gibi bir HMG CoA redüktaz inhibititörü olan rozuvastatinin beyin felci sonrası hasar alanında küçülülmeye neden olduğu, vaskularizasyon için önemli endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS) sentezini ve protein seviyelerinde arttırdığı ve pro-enflamatuvar indüklenebilir NOS (iNOS) miktarını düşürdüğü, sters kinazların protein seviyelerini düşürdüğü, plastisiteye olumlu katkıda bulunduğu da yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (14, 41-43). Bu sebeple statinler beyin felci tedavi sürecinde kullanılabilecek ilaçlar grubuna girmekte ve atrovastatin ve simavstatinden daha güçlü bir HMG KoA redüktaz olarak etki etmektedir.

4.3.1.1.4. Anjiotensin II dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin II blokörleri

Kan basıncını yükseltmenin yanı sıra VCAM-1, IL-6, MCP-1 gibi proenflamatuvar moleküllerin sentezini arttırmalarından ötürü anjiyotensin II iskemi tedavisinde hedeflenen moleküllerden biridir. Bu anlamda hem enzim inhibitörleri hem de anjiyotensin blokörleri anti enflamatuvar aktivite göstererek hasarın yayılmasını engellenmesine katkıda bulunmaktadırlar (44).

4.3.2. Nöroprotektif ajanlar

Bu başlık altında incelenebilecek yöntemler sırası ile serbest radikal yakalayıcıları (melatonin ve edaravon gibi), nöral kök hücre nakli, kaspaz inhibitörleri ile apoptozun baskılanması, oksijenden yoksun alana yoksunluğu telafi etmek amaçlı hiperbarik oksijen tedavisi ve bunların serbest radikal yakalayıcıları ile kombine edilmiş tedavileri, minosiklin gibi antaenflamatuvar antibiyotiklerin t-PA ile kombine edilmiş tedavileri sayılabilmektedir (45-49). Sayılan moleküllerin dışında eritropoietin, östrojen ve NOS inhibitörleri de beyin felci tedavisinde kullanılan nöroprotektif ajanlar grubuna girmektedir (50-53).

4.3.3. Beyin farmakoterapisi

Nörolojik hastalıklara alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak farmakolojik tedavilerin sunulması ile birlikte bu alan modern nörolojide büyük ilgi görmeye başlamıştır. Fakat son otuz yıllık süreçte klinik vakalarda karşılaşılan problemler ve başarısızlıklar (54) araştırmacıları farmakoterapi alanının içerdiği ciddi kısıtlamalarla karşı karşıya getirmiş ve gelişmelerin sürekliliğini önemli ölçüde sekteye uğratmıştır (55). Bu durum kan beyin bariyeri (KBB) olarak adlandırılan seçici geçirgen fizyolojik yapının, kanda taşınan biyolojik moleküllerin beyin parankimasına giriş ve çıkışını kontrol eden biyolojik bir bariyer olarak davranmasından kaynaklanmaktadır (56). KBB'nin seçici geçirgen özelliği temel olarak toksik bileşenlerin Merkezi Sinir Sistemi’ne (MSS) girişini güçleştirmek ve besin ve oksijen girişini sağlarken aynı zamanda beyinden kana metabolik artıkların geçişini kontrol etmektir. Bunun yanı sıra farmakolojik bileşenlerin de beyine geçişine izin vermediğinden beyin farkolojik tedavileri oldukça zorlaştırmaktadır (57).

4.3.4. Kan beyin bariyeri fizyoloji ve anatomisi

Kan beyin bariyeri serebral kan damarlarını çevreleyen ve nörovasküler ünite (NVÜ) olarak adlandırılmış ünitelerden oluşan sürekli anatomik yapıdır. Bir nörovasküler ünite içerisinde endotel hücreler, perisitler, astrositler, bazal membran yapıları esas olarak bulunup, zaman zaman mikroglia ve nöronlar da barınmaktadır. Bu mahiyeti ile NVÜ terimi KBB boyunca periferik dolaşım ve MSS arasında dinamik ve karmaşık bir bağlantı sistemini ifade etmektedir (58).

4.3.4.1. Endotelyal hücreler

Serebral kan damarlarını oluşturan endotelyal hücreler, perferik kan damarlarındaki diğer endotel hücrelerden farklı olarak serebral kan damarlarının çeperlerinde sıkı bağlantılar oluşturmaktadırlar. Bu sebeple endotelyal hücreler KBB'nin çatısı olarak değerlendirilmekte ve kan ile beyin parankimi arasında kurulan fiziksel bariyerin ilk basamağını oluşturmaktadırlar. Endotel hücrelerin kurduğu sıkı bağlantılar iki alt başlıkta incelenebilirler: vasküler endotelyal ve nöral kaderinlerden (V-Kaderin ve N-Kaderin) oluşan aderent bağlantılar ve klaudin, okludin gibi transmembran proteinler ile stoplazmik zona okludenslerin dahil olduğu sıkı bağlantılardır (59-61). Aderent ve sıkı bağlantılar sayesinde, normal hücre membranından difüzyon yolu ile geçebilen küçük hidrofobik moleküller ve hatta iyonların KBB boyunca difüzyonları oldukça güçleşmiştir. Bu özgün yapı, gün içerisinde fiziksel aktivitedeki ufak bir artış sonrası kanda konsantrasyonu artan K^+ iyonlarının difüzyonunu engelleyerek epileptik ataklardan beyni korumak gibi birçok avantaj sergilese de MSS rahatsızlıklarında beyine ilaç girişini ve MSS tedavilerini güçleştirmektedir.

KBB'nin kimyasal bileşiklerin beyine erişimini kısıtlaması her zaman bariyer görevi sayesinde gerçekleşmez. Endotelyal hücreler, hücre membranında içeri ve dışarı yönlü olarak taşıma yapan proteinler ve polipeptidler bulundurmaktadırlar. Bu moleküller, substratlarını kimyasal gradyenlerinin tersi yönünde aktif olarak taşıyarak beyine ilaç girişini kontrol etmekte ve çoğu zaman engeller nitelikte görev almaktadırlar (18). Bu bağlamda yaygın olarak bilinen ve üzerinde araştırmalar yapılan taşıyıcı

proteinlerin çoğu, ATP ye bağımlı kaset (ABC) taşıyıcı süper ailesine ait olup, bu taşıyıcılar bariyer boyunca ilaçların dışarıya pompalanmasından sorumludurlar. Hedeflenebildikleri takdirde akut dönemde gelişen hasarın engellenmesi mümkün görünmeleri sebebi ile ABCB1 taşıyıcısının beyin felci farmakoterapisindeki öneme sahiptirler. Anlatımlarının beyinde özellikle iskemiye dirençli bölgelerde iskemiyi takiben 3. saatte artış gösterip 24. saate kadar yüksek seviyelerde kaldıktan sonra bazal seviyeye ABCB1 taşıyıcılarını daha güçlü bir akut dönem hedef molekülü kılmaktadır. (62). Bunun yanı sıra, farelerde yapılan bir başka çalışmada aynı aile içinde sınıflandırılan ABCC1'in anlatımının orta serebral arter tıkanması sonucu düştüğü ve buna ABCC1'in nöroprotektif bileşen olan substratlarının iskemik beyinde birikiminin düşmesinin eşlik ettiği de gösterilmiştir (63). Bu çalışmada ABCC1'in karakteristiğinin, kılcal damarlara içeri yönlü ilaç taşınmasından sorumlu olan solüt taşıyıcı (*solute carrier)* SLCO ailesine benzediği ve ABCC1'in beyinde ilaç birikimine neden olmasının dolaylı olarak SLCO ailesinin beyin farmakoterapisindeki potansiyel rolüne işaret ettiği not edilmiştir.

4.3.4.1.1. SLCO ailesi ve Oatp1a5

SLCO taşıyıcıları substratları olan bileşenlerin beyne trans-hücresel iletimlerinden ve aynı zamanda beyinden kana taşınmalarından sorumludurlar. Taşıyıcı ailesi üyelerinden yaklaşık 300 protein 43 aile olarak sınıflandırılmıştır (3). Bu ailelerden SLC21ve SLC22A taşıyıcılarının geniş bir yelpazede organik anyon bileşenlerinin taşınmasında önemli rol aldıkları gösterilmiştir.

Oatp1a4 ve Oatp1a5 farede bu organik anyon taşıyıcı ailelerinin üyesi olan, insanda ise OATP1A olarak tek bir izoformu bulunan SLC21 ailesi taşıyıcılarıdır. Anlatımları ilk defa beyin ve retinada DNA homoloji kopyalama metodu ile tespit edilmiştir (64, 65). Çok geniş bir substrat yelpazesine sahip Oatp1a4'in taşınmasından sorumlu olduğu substratlarından bazıları; safra asitleri, kardiyak glikozitler; N-metil kuinidin, N metil kunin gibi organik katyonlar ve BQ123 gibi organik polipeptitleridir (64-68).

Oatp1a4 ve 1a5'in substrat taşımasında itici güç olarak etkin faktörün ne olduğu tam olarak bilinmemekle beraber taşıma kapasitelerindeki artış trans-uyarılma ile gerçekleşebildiği gösterilmiştir. Taşımalarının baskılanmasının da benzer şekilde trans-uyarılma ile gerçekleştiği; *Xenopus laevis* oositlerinden Oatp1a4'ün subtratı dinitrofeninin dışarı yönlü atımının glutatyon ile arttırıldığı gözlenmiştir (69).

Oatp1a5 ise ilk olarak rat retina cDNA kütüphanesinden kopyalanmıştır. Kan retina bariyerinin yanı sıra mRNA anlatımlarının akciğer, serebellum, serebral korteks ve ince bağırsakta gerçekleştiği gösterilmiştir (70). Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları analizleri Oatp1a5'in anlatımının KBB'de koroid pleksusta da olduğunu kanıtlamıştır (70-73). Buna rağmen beyin kapilerlerindeki membran lokasyonları net olarak belirlenememiştir (72).

Substratları içerisinde temek olarak amfipatik organik anyonlar bulunmaktadır ve substratlarının beyne iletiminden sorumludurlar (71). Safra asitleri, steroit bileşikler ve tiroid hormonu gibi endojen substratlarının yanı sıra, atorvastatin ve rozuvastatin gibi HMG KoA redüktaz inhibitörlerinin de taşınmalarından sorumlu oldukları gösterilmiştir (64-68).

4.3.4.2. Nörovasküler üniteyi oluşturan diğer yapılar

NVU oluşturan diğer esas elementler ise perisitler, astrositler, bazal membran yapılarıdır. Nörovasküler yüzeyin yaklaşık %40'ını oluşturan perisitler, isimlerini serebral kan dmarlarının etrafında konumlanan karmaşık hücresel uzantıları çevreleyerek oluşturdukları morfolojik şekilden almaktadırlar (74). KBB'de bulunan endotel hücrelerden fiziksel hücrelerden ayrılmış olmalarının sebebi, basal membrana tamamen gömülmüş olmalarıdır. Bununla birlikte KBB'yi oluşturan endotel hücreler ile adherent bağlantlar ve boşluklu bağlantılar üzerinden iletişim kurmaktadırlar. Perisitlerin esas görevlerinden biri perivasküler alanda damar yarıçaplarını belirlemek sureti ile beyin kan akım hızını düzenlemektir. Sahip oldukları çok sayıda düz kas aktini sayesinde nöronal aktiviteye bağlı olarak kan akımının düzenlenmesinde rol alırlar (75).

Beyin felci sırasında ise glutamat ile tetiklenen prostaglandin E_2 ve nitrik oksit salınımı perisitlerin gevşemesine ve damar yarıçapının artışına yardımcı olmaktadır (76).

Beyinde en fazla sayıda bulunan hücre tipi olan astrositler çok sayıda işlevin gerçekleşmesinden sorumludurlar. KBB düzenlenmesinin ötesinde sinaps oluşumunda, nörotransmitterlerin alım ve geri dönüşümlerinde, nöronların beslenmesinde, MSS'de enflamatuvar cevabın yönlendirilmesinde rol almaktadırlar (77). Astrositlerin KBB üzerindeki etkisi nörovaskülatürün %99'unu astrosit uzantıları ile kaplanmış olmasından anlaşılmaktadır (78). Bu uzantılar bazal membran abluminal yüzüne hücre dışı matriks proteinleri ile tutunmaktadırlar. Perisitlerin aksine, KBB ile hücreler arası bağlantılar bulundurmadıklarından endotelyal bariyer özelliklerini suda çözünebilir faktörler üzerinden sergilerler. Bu durum *in vitro'*da hem astrositler ile eş kültüre edilmiş endotelyal hücre kültürlerinde hem de astrosit şartlandırılmış medium ile kültüre edilmiş endotelyal hücre kültürlerinde sıkı bağlantıların, metabolik enzimlerin ve taşıyıcıların KBB fenotipi oluşturduğu çalışmalardan anlaşılmaktadır (79, 80).

NVÜ'nün aselüler kısmı olan ve çoğu zaman ihmal edilmekle birlikte aslında yüksek derecede dinamik bir yapıya sahip kısmı bazal membrandır. Yapısı son derece karmaşık hücre dışı matriksten oluşmaktadır. Temel olarak fibronektin, agrin, osteonaktin, glikozaminoglikanlar ile desteklenmiş tip IV kollajen, laminin, nidojen ve perlekan içeriğine sahiptir (81). Lamininlerin dağılımı bazal membran işlevlerini direk etkilemekte ve özellikle T hücre geçişlerini kontrol etmektedirler (82).

5. MATERYAL METOD

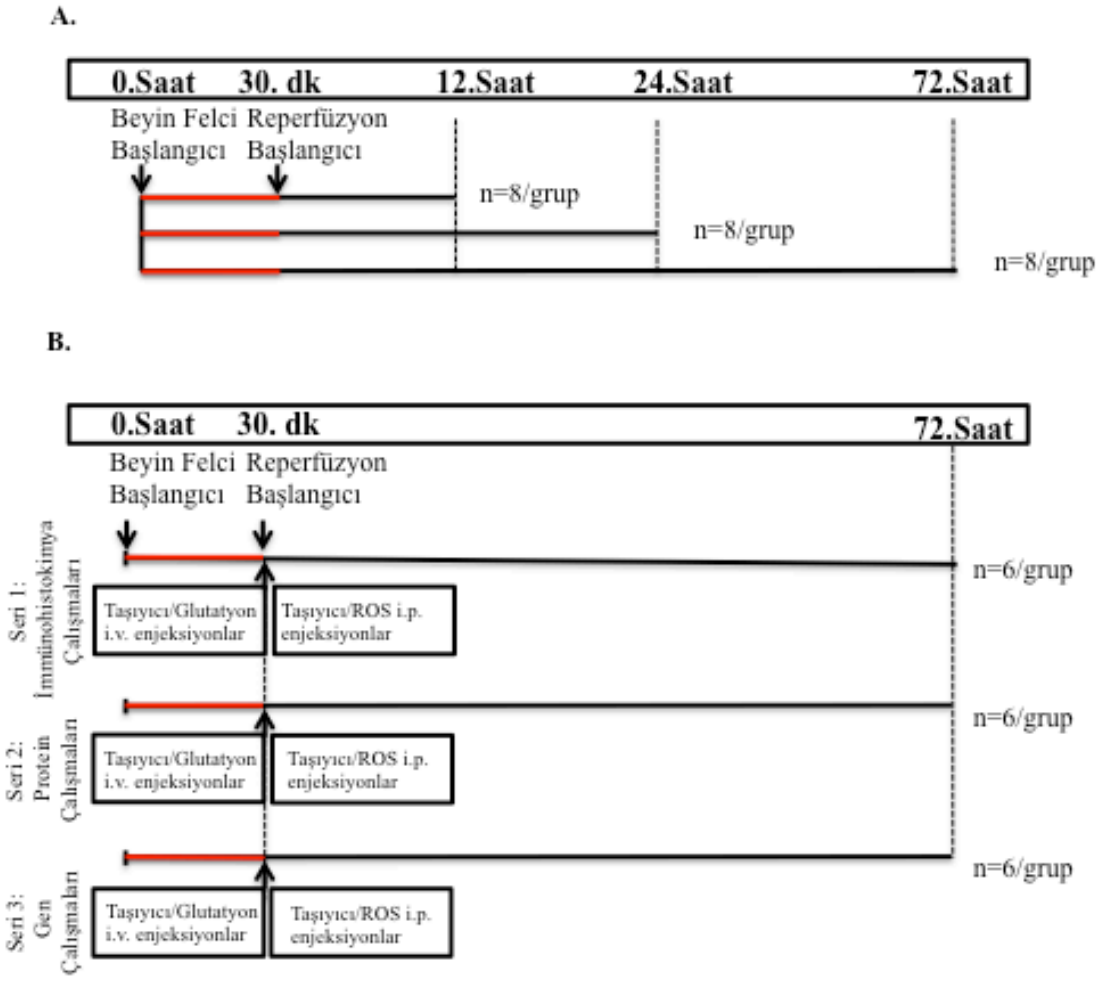
5.1. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO)

8-10 haftalık, 20-25 gr ağırlığında, yetişkin erkek Balb-c fareler %1 isofluran (N0015A09; Adeka), %30 O_2 ve kalanı N_2O ile anesteziye alınmıştır. Geri besleme kontrollü hemotermik ısıtıcı sistem ile (Harvard Apparatus) rektal sıcaklık 36,5-37 °C arasında tutulmuştur. OSAO ve reperfüzyonun gerçekleştiğinin kontrolü olarak Lazer Doppler'in probu (Perimed, Stockholm, Sweden) ile Lazer Doeppler akımı (LDF) kaydı alınmıştır. Bu amaçla Lazer Doeppler'in probu, Bregma -2 mm koordinatına korteks üzerine 0,5mm'lik açıklıktan yerleştirilmiştir.

30 dakikalık fokal serebral iskemi intraluminal teknik ile gerçekleştirilmiştir. Özetle, farenin boyun bölgesinden bir orta hat kesisi açılmış, sol orta ve eksternal karotid arterler izole edilip 6-0 lık naylon ip (S1165; Doğsan) ile bağlanmıştır. Mikrovaskular bir kıskaç (FE691: Aesculap, Tuttlingen, Germany) geçici olarak internal karotid arter üzerine yerleştirilmiş ve ardından komon karotid arter üzerinde küçük bir kesi atılmıştır. Silikon resin (Xantropen; Heraeus) ile kaplanmış 8-0'lık naylon bir monofilment açılan bu kesiden damar içerisine iletildikten sonra mikrovaskular kıskaç çıkarılmış ve monofilament OSAO için distalde 9 mm ilerletilmiştir. Oklüzyonun 30. dakikasında monofilamentin geri çekilmesi sureti ile reperfüzyon başlatılmıştır.

Deney grupları; Oatp1a5'in reperfüzyon sonrası zamana bağlı olarak mikrodamar parçacıklarındaki anlatımını takip etmek (Şekil 1A) ve Oatp1a5'in glutatyon ile baskılanmasının substratı olan rozuvastatinin beyin dokusuna geçişine olan etkisini araştırmak (Şekil 1B) için iki ayrı sete bölünmüştür. İlk sette hayvanlar reperfüzyonun başlangıcını takiben sırası ile 12, 24 ve 72. saatlerde sakrifiye edilmiş ve kapiler zenginleştirme yöntemi ile kortikal dokudan mikrodamar parçacıkları toplanmıştır (n=8). İkinci sette ise reperfüzyonun hemen ardından araç (serum fizyolojik (%0.9 izotonik sodyum klorür solüsyonu; Biofleks)), glutatyon (1mM; PHR1359; Sigma), rozuvastatinin Oatp1a5 üzerinden beyin parankimine geçişini engellemek amacı

ile, damar içi (i.v.) olarak kuyruğa yerleştirilen kanül ile verilmiştir. Aynı zamanda araç (0.2 ml/kg dimetil sülfoksit (DMSO) (A367210100; Aplichem)), rozuvastatin (ROS) (1955-25; Biovision) 2 mg/kg ve ROS 20mg/kg periton içi (i.p.) olarak verilmiştir. İmmünohistokimya çalışmaları, protein çalışmaları ve gen çalışmaları için aynı setten toplamda 3 seri çalışılmıştır (n=6). 72 saatlik reperfüzyon sonrasında hayvanlar sakrifiye edilmiştir.



Şekil 5.1.1: 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modeli deney setleri. A. Oatp1a5'in ekspresyon analizi serisi. Her bir zaman noktası n=8 olmak üzere 1'er gruptan oluşmakta ve toplamda 24 hayvan içermektedir. **B.** İmmünohistokimya, protein ve gen çalışmaları serileri. Her seri (1) Serum fizyolojik (SF) + DMSO (30.dakika); (2) Glutatyon + DMSO (30.dakika); (3) SF + ROS 2mg/kg (30.dakika); (4) Glutatyon + ROS 2mg/ kg (30.dakika); (5) SF + ROS 20mg/kg (30.dakika); (6) Glutatyon

+ ROS 20mg/kg (30.dakika) ve n=6 olmak üzere 6 gruptan oluşmakta ve 36 hayvan içermektedir. 30. dakikadaki enjeksiyonlar intravenöz (i.v.) ve intaperitonel (i.p.) olarak uygulanmıştır. Deney setlerinin tümü toplamda 4 seri ve 132 hayvan içermektedir.

5.2. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi

MSAO sonrası reperfüzyonu takiben Şekil 1A'daki set için 12, 24, 72. saatlerde; 1B'deki set için ise 72. saatlerde hayvanlar anesteziye alınıp dekapite edilerek veya normal salin ile trans kardiyak perfüzyon yapılarak sakrifiye edilmiştir. Elde edilen beyin dokuları kuru buzda dondurulmuş ve histolojik analizler için kesitlerin alınacağı zamana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.3. Histolojik Değerlendirmeler İçin Kesitlerin Alınması

Pozitif yüklü lamlar (Objekttrager; ISOTHERM) öncelikle ısıtıcı tabla üzerinde 40°C'de 20 dakika kadar ısıtılmıştır. Daha sonra Bregma seviyesinden 20 μm'lik koronal kryostat kesitleri pozitif yüklü lamlara alınmış, 30 dakika boyunca ısıtıcı tabla üzerinde 40°C'de ısıl işlem uygulanarak dokuların lamlar üzerinde fikse edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen kesitler -80°C'de muhafaza edilmiş, daha sonraa Cresyl violet, TUNEL ve immunflorasan boyamalarda kullanılmıştır. Beyin dokularından aynı zamanda Western blot analizi ve beyindeki rosuvastatin içeriğinin ölçümleri için de motor korteksten iskeminin ipsilateral ve kontralateral kısımlarından (bregmaya 0-2 mm kaudal uzaklıktan) doku örnekleri alınmıştır.

5.4. Cresyl Violet Boyaması

Histolojik beyin hasarı analizi için alınan kesitlere Cresyl violet Asetat (C5042, Sigma) boyaması yapıldı. PFA ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edilen kesitler, 282ml 0.1 M asetik asit (27225; Sigma) ve 18 ml sodyum asetat (32319; Sigma) içeren solüsyonda %0.5 oranında çözülen cresyl violet ile 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra önce distile su sonra sırası ile %70, %90, %95 ve %100 alkol serilerinden geçirilen kesitler 3 dakika xylene (534056; Sigma) inkübasyonuna bırakılmıştır. Son olarak kesitler entellan (1.07961.0500; Merck Millipore) ile kapatılmıştır. Axio Zoom mikroskobunda görüntülerinin alınmasının ardından her biri 62,500 μm^2 alana sahip

toplamda 12 bölgeden kör bir şekilde Cresyl violet ile boyanan nöron gövdeleri sayılarak nöronal sağ kalım analizleri yapılmıştır.

5.5. DNA Kırıklarının Analizi

Çalışmada apoptotik hücrelerin sayılarındaki değişikliklerin tespit edilebilmesi için TUNEL boyaması, yapılmıştır.Bu amaçla, In situ Cell death Detection Kiti ile (11684795910; Rosche) iskemik striatumda DNA kırıkları florasan işaretlenmiştir. Tüm gruplardaki hayvanlardan eşit seviyelerden alınan kesitler % 4 paraformaldehit (158127; Sigma) içeren 0.1 M Fosfat Tamponlu Salin (PBS) içersinde fikse edilmiş, keçi serumu ile oda sıcaklığında bir saat bloklandıktan sonra kit içerisindeki florasan işaretli dUTP ve deoksi nükleotidil transferaz enzimi, DNA kırıklarını işaretlemek üzere kesitlere eklenmiş ve 70 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Boyama sonrasında TUNEL pozitif hücreler, konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir. Kesit görüntülerinin alınmasının ardından her biri 62,500 μm^2 alana sahip toplamda 12 bölgeden kör bir şekilde TUNEL pozitif hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

5.6. Beyin Kapiler Zenginleştirme Yöntemi ile Mikro Damar Parçacıklarının Eldesi

Oatp1a5'in Western blot analizleri mikro damar parçacıkları örneklerinden yapılmıştır. Zenginleştirilmiş mikro damar parçacıkları; kontrol, 30 dakika OSAO ve 12, 24 veya 72 saat reperfüzyon uygulanmış Balb/c farelerinin beyinlerinden elde edilmiştir. Aynı deney grubuna ait hayvanların beyin örnekleri toplanıp tartıldıktan sonra içerisinde %1 bovin serum albümin (BSA) (A7906; Sigma), 10 mM -2-hidroksietilpiperazin-N-2-etanesulfonik asit (HEPES) (H3375; Sigma) ve % 5 proteaz inhibitörü karışımı (5827S; Cell Signaling) (pH 7,4) bulunan Ringer's solüsyonu içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 15 dakika 1.500 g'de santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet tekrardan çözüldükten sonra 10 dakika 1.500 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşulan pellet 0.25 M sükroz (800-081-LG; Multicell) (pH 7.0) içerisinde çözüldükten sonra 1.0- 1.5M sükroz gradiyentine alınıp 30 dakika 58.000 g koşullarında Beckmann ultra santrifijünde santrifüj edilmiştir. Elde edilen örnek 3 ayrı

fraksiyondan oluşmakta olup, örnek içerisindeki pellet hedeflenen zenginleştirilmiş serebral mikro damar parçacıklarını temsil etmiştir.

5.7. Protein Çalışmaları

5.7.1. Protein izolasyonu

Çalışmada analizleri yapılan diğer proteinlerin doku örnekleri Şekil 1B'de Seri 2'ye ait operasyon geçirmiş hayvanların iskemik beyinlerinden alınmıştır. 72 saat reperfüzyon sürelerini dolduran fareler dekapite edilerek beyinlerinden motor korteksten iskeminin ipsilateral ve kontralateral tarafından (Bregmaya 0-2 mm kaudal uzaklıktan) 50 μm'lik kesitler halinde alınmıştır. Hem şekil 1A, hem de şekil 1B'de belirtilen, aynı gruptaki doku örnekleri bir araya getirilmiş, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımları içeren parçalama tamponu içerisinde (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 M EDTA, protease inhibitor coctail; #20-201, Millipore) 20 dakika buz üzerinde homojenizatör (Silent Crusher S, # 595-05000-00; Heidolph) yardımı ile homojenize homojenize edilmiştir. Örnekler 15.000 g'de 15 dakika santrfüj edildikten sonra supernatant alınmıştır.

5.7.2. Protein konsantrasyonu ölçümü ve blotların hazırlanması

Protein konsantrasyonlarının tayini için Qubit® Protein çalışma kiti (Q33211; Invitrogen) kullanılmış ve ölçümler Qubit Fluorometer 2.0 (# Q32866; Invitrogen) cihazı ile yapılmıştır. Ölçümlerden sonra örnekler analize kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Eşit miktarlarda protein, 2X veya 4X laemmli tamponu (#161-0737; Bio-rad) ve kalanı su olacak şekilde hesaplamaları yapılan ve eşit hacimlerde hazırlanan blotlar 95°C 'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir.

5.7.3. Western Blot

Örnekler, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sistemi kullanılarak Any kD™ Mini-PROTEAN jellerine (83-9036, Bio-rad) yüklenmiş ve 100V'ta 2 saat yürütülerek molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Elektroforezin tamamlanmasının ardından örneklerin poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarılması sırasında Bio-Rad Transblot yarı ıslak blotlama sistemi ve Mini PVDF Transfer Kitleri (#170-4272; Bio-rad) kullanılmıştır. Membranlar, spesifik olmayan antikor bağlanmasını engellemek amacı ile % 0,1 Tween-20 (P1379; Sigma) içeren tamponlanmış Tris salin (T1503; Sigma) (TBS-T) içerisinde % 5 oranında çözülmüş yağsız süt tozu (#sc-2325; ChemCruz) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 3 kere 5'er dakika TBS-T ile yıkanmış ve % 5 yağsız süt tozu ile 1:500 oranında keçi poliklonal Oatp1a5 antikoru (sc-47265; Santa Cruz) içeren TBS-T içerisinde 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Apoptotik sinyal yolaklarının aktivasyonalrının protein seviyesinde takibi ve değerlendirmeleri için membranlar verilen antikorlar ile de aynı şekilde 1 gece inkübe edilmiştir; p21 (Waf1/Cip1, rabbit mAb, Novus #NB100-80042), aktif kaspaz-3 (rabbit poliklonal, Cell Signaling #9661), aktif Kaspaz-8 (rabbit poliklonal, Cell Signaling #9429), aktif kaspaz-9 (rabbit poliklonal, Cell Signaling #9509), aktif kaspaz-1 (goat poliklonal sc-22165) ve Bax (rabbit, Cell Signaling #2772). İkinci gün membranlar 3 kere 5'er dakika TBS-T ile yıkanmış ve fare (goat anti-mouse) IgG, Horse Raddish Peroxidase (HRP) konjuge edilmiş, (sc-2055 Santa Cruz), rabbit (goat anti-rabbit IgG) HRP konjuge edilmiş (sc-2004 Santa Cruz) ve goat (donkey anti-goat) IgG HRP konjuge edilmiş (sc-2020 Santa Cruz) antikorlarından uygun olanı ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Proteinlerin, tekrar 3 kere 5'er dakika TBS-T ile yıkanan membranlardan kemiluminesans olarak görüntülenmesi Bio-Rad görüntüleme kiti ile (Clarity™ Western ECL Substrate, #1705060) gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme sırasında ChemiDoc MP (Biorad) görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

5.7.4. Stripleme

Membranların stirplenmesi için üzerlerine stripp tamponu eklenmiş ve 20 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde 50°C'ye ayarlanmış fırında inkübe edilmiştir. Stripp tamponunun uzaklaştırılması için 6 kere 5'er dakika yıkanan membranlar önce yeniden % 5 yağsız süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat bloklanmış, daha sonra farklı bir antikor kullanılarak (p-p21 bakılan membrana p-21 primer antikoru eklenmesi gibi) görüntüleme işlemleri daha önce belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.7.5. Değerlendirme

Sonuçların değerlendirilmesi Image J progarmı ile gerçekleştirildi. ChemiDoc MP sisteminden JPEG olarak dışa aktarılan resimler 8 bit'e dönüştürüldükten sonra her bir kuyunun densite değerleri piksel üzerinden hesaplandı (0-256 piksel arası). Her membrandan ayrı ayrı ölçülen, arka plana ait densite değerleri deney gruplarından çıkarıldıktan sonra elde edilen değerler iç kontrol olarak seçilen beta actin değerlerine göre normalize edildi. Sonuçlar daha sonra istatistiksel analize tabi tutuldu.

5.8. İmmünflorasan Boyamalar

Oatp1a5 proteinin hücreye özgü konumunu belirlemek amacı ile immünflorasan boyamalar gerçekleştirilmiştir. -80°C'den çıkarılan kesitler yarım saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, daha sonra % 4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edilmiştir. % 1 BSA içeren PBS içerisinde 1 saat bloklandıktan sonra kesitlere ilgili işaretleyicileri temsil eden primer antikorlar eklenmiştir. Nöronal işaretliyici olarak NeuN 488 konjuge (MAB377X; Millipore) ve MAP2 (ab1426; Abcam) glial işaretleyici olarak GFAP 555 konjuge (3656S; Cell signaling), mikroglial işaretleyici olarak Iba-1 (sc28530; Santa Cruz) endotel hücre işaretleyicisi olarak ise CD31 (ab28364; Abcam) antikorları kullanılmıştır. Oatp1a5 antikoru ikili boyamalar için ilgili antikorlar ile kombine edilmiş ve antikor solüsyonu kesitlere eklenerek 1 gece +4°C'de karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Kesitler ertesi gün 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, florasan işaretli donkey anti goat 488 (A11055; Invitrogen), chicken

anti goat 594 (A21468; Invitrogen) , goat anti rabbit 488 (A11008; Invitrogen), goat anti mouse 488 (A11001; Invitrogen), chicken anti mouse 488 (A21200; Invitrogen), goat anti moıse 555 (A21424; Invitrogen) antikorlarından ilgili primer antikorla eşleşenleri ile bir saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde sekonder antikor inkübasyonuna bırakılmıştır. 2. kere 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitlere çkirdek boyamaları için 1:1000 oranında PBS içerisinde sulandırılmış 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (D9542; Sigma) solüsyonu eklenmiştir. 3 dakikalık DAPI inkübasyonundan sonra 1 kere PBS içerisinde yıkanmıştır. Kağıt peçete ile kurutulan kesitlere mounting medium (F4680; Sigma) damlatılmış ve kesitler lamel ile kapatılmıştır. 1 gece oda sıcaklığında kurumaya bırakılan kesitlerden confocal mikroskobu ile görüntüler alınmıştır.

5.9. mRNA Analizleri

5.9.1. RNA izolasyonu

72 saat sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan beyin dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirmek için Qiagen AllPrep RNA/DNA/Protein İzolasyon kiti kullanılmıştır (80004; Qiagen). Aynı gruba ait dokular bir araya getirildi ve kit içerisinden çıkan protokole uygun olacak şekilde önce 600 uL RLT lizis tamponu eklenerek cam homojenizatöre alınmıştır. İlk aşamada homojenizatörde ezerek parçalama, daha sonra ise 21G enjektörden geçirmek sureti ile dokuların tamamen homojenize olması sağlanmıştır. 1.5 ml lik deney tüplerine alınan dokular 18.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kit içerisinden çıkan DNA yükleme kolonuna aktarılmış ve sıvı fazın kolondan akmasına izin verilmiştir. Daha sonra kolona sıvı faz ile eşit hacimde %70 lik etil alkol eklenmiş ve bu fazın da kolondan akmasına izin verilmiştir. Elde edilen süspansiyon yine kit içerisinden çıkan RNeasy spin kolonuna yüklenmiş ve 10.000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. RW1 yıkama çözeltisi ile 1 defa, ardından RPE yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkanan kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve boş olarak 1 dk 18.000 g'de santrifüj edilerek kuruması sağlanmıştır. Kolonun altına temiz bir mikrosantrifüj tüpü yerleştirildikten sonra ve kolona 50 µl RNase içermeyen su ilave edilmiştir. 10.000 g'de 1 dakikalık yapılan santrifüj sonunda

RNA örnekleri mikrosantrifüj tüpüne geçmiş ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.9.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA ların konsantrasyonlarının ölçümü Implen P330 NanoPhotometer cihazında OD260 densite değerinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin saflığının tayini için OD260/280 ile OD260/230 değerleri de okunarak hesaplamalar yapılmıştır. cDNA sentezi için Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (04896866001; Roche) ile yapılmıştır. RNA örneği olarak, okunan değerlere göre her bir örnekten 1 ug RNA'ya denk gelecek hacim reaksiyon karışımına 0,2 ml'lik PZR reaksiyon tüpü içerisinde eklenmiştir. Bunun yanı sıra rastgele primerler ve oligo (dT) primerler de aynı reaksiyon tüpüne eklenip karıştırıldıktan sonra bir termal döngü cihazında (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra buz üzerine alınan örneklere tablo 1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ana karışımdan her tüpe 10.5 µl olacak şekilde paylaştırma yapılmıştır. Her reaksiyon/ tüp için 30 µl toplam hacme ulaşıldıktan sonra örnekler tekrar termal döngü cihazına alınmış ve sentez reaksiyonunun gerçekleşmesi için 50 °C'de 1 saat; enzim inaktivasyonunun gerçekleşmesi için 80°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonun tamamlanmasını takiben elde edilen çözeltiler gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere; stok, 1:10 ve 1:100 dilüsyonlar halinde hazırlanmış ve -80 C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 5.9.2.1: cDNA sentezi için hazırlanan ana karışım içerikleri

	1 Reaksiyon için (µl)	25 Reaksiyon (µl)
Rev. Trans. Buffer (5X)	6	150
dNTP mix (25X)	3	75
Rev.Trans. Enzim	0,75	18,75
RNase Inhibitor	0,75	18,75

5.9.3. Gerçek zamanlı PZR ve analizi

Gerçek zamanlı PZR analizleri ile gen anlatımlarındaki değişiklikleri tayin edebilmek için Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix karışımı kullanılarak hazırlanan örnekler Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazında analiz edilmiştir.

Tablo 5.9.3.1: Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan ana karışım içerikleri

	1 Reaksiyon için (µl)	25 Reaksiyon (µl)
Total RNA	5	125
Oligo	0,5	12,5
Random Primerler	1	25
ddH_2O	6,5	162,5

Her bir DNA örneği (grup) ve gen için hazırlanması gereken ana karışım tablo 2'de belirtildiği üzere fakat cDNA eklenmeden hazırlanmıştır. İlk önce ana karışım kuyu başına 9 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu gerçek zamanlı pzr plakasına (Bio-Rad, Hard Shell PCR Plate) dağıtılmıştır. Daha sonra uygun cDNA örnekleri ilgili kuyucuklara eklenmiştir. Plate düzeni her örneğin 3 tekrarlı çalışıldığı şekilde belirlenmiş, dolayısı ile analiz sonunda her örnekten 3 er okuma alınarak teknik hata riski düşürülmüştür. Reaksiyon, optimize edilmiş termal profilde (98 °C'de 30 sn, [95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn]x40 döngü; ardından melt analysis için 55 °C'den 95 °C'ye 0,5 sn) gerçekleştirilmiştir. Tablo 3'te reaksiyon sırasında kullanılan genler ve ilgili primer dizileri çiftler halinde verilmiştir. Analiz için Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazına ait CFX Manager programı kullanılmıştır.

Tablo 5.9.3.2: Gerçek zamanlı PZR'de kullanılan primer çiftleri dizileri

Gen adı	**DNA dizisi**
GAPDH	F: 5' – AGGTCGGTGTGAACGGATTTG – 3' R: 5' – TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA – 3'
B-aktin	F: 5' – GGCTGTATTCCCCTCCATCG – 3' R: 5' – CCAGTTGGTAACAATGCCATG – 3'
IL1B	F: 5' – GCAACTGTTCCTGAACTCAACT – 3' R: 5' – ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT – 3'
TNFa	F: 5' – CCCTCACACTCAGATCATCTTCT – 3' R: 5' – GCTACGACGTGGGCTACAG – 3'
TGFb1	F: 5' – CTCCCGTGGCTTCTAGTGC – 3' R: 5' – GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG – 3'
VEGF-B	F: 5' – GCCAGACAGGGTTGCCATAC – 3' R: 5' – GGAGTGGGATGGATGATGTCAG – 3'
VEGF-A	F: 5' – ACCATGAACTTTCTGCTCTCTTG – 3' R: 5' – GAACTTGATCACTTCATGGGACT – 3'
MMP9	F: 5' – CTGGACAGCCAGACACTAAAG – 3' R: 5' – CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG – 3'

5.9.4. Analiz

Cihazdan alınan veriler; kontrol (sadece araç uygulanan grup), araç ve Glutatyon, 2mg/ kg Rosuvastatin, 2mg/kg Rosuvastatin ve Glutatyon, 20 mg/kg Rosuvastatin, 20 mg/kg Rosuvastatin ve Glutatyon alan gruplar için tüm genler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Ham veriye karşılık gelen cycle treshold değerlerinin 2 adet iç kontrol (B-aktin ve GAPDH) değerlerine göre normalize edilebilmesi için;[ΔCT=CT (hedef gen)−CT ((GAPDH+B-aktin)/2)] formülü kullanılmıştır. Hedef genin anlatım profilindeki değişikliğin katının tayini için kullanılan formülünde ise her bir zaman deney grubunda kontrol grubunun ΔCT değeri kalibratör olarak kullanılmıştır. Buna göre kullanılan [ΔΔCT=ΔCT(örnek)−ΔCT(kalibratör)] formülü ile ΔΔCT değerleri hesaplanmıştır. Deney gruplarının kontrol grubuna kıyasla gen anlatım profilindeki değişikliklerin kantitatif değerleri olan kat değişimleri ise relatif kuantifikasyon (RQ) formülü uygulanarak [2-ΔΔCt] hesaplanmıştır.

5.10. İlaç Ölçüm Analizleri

5.10.1. Enjeksiyonların yapılması ve dokuların temini

2mg/kg ve 20mg/kg doz uygulamasının, striatumda rozuvastatin birikimine olan etkisi ve glutatyonun bu birikim üzerinde aldığı rolü incelemek amacı ile T-QS cihazında serum ve striatum doku örneklerinden kantitatif ilaç ölçümü yapılmıştır.

Rozuvastatin, farede 7.3 saatlik bir yarı ömre sahip olması nedeni ile, ölçümler için 72 saat sonunda sakrifiye edilen hayvan setlerinden ayrı bir set kullanılmıştır (84). Bu amaçla hayvanlar daha önce belirtilen 6 adet gruba n=4 olacak şekilde bölünmüş ve SF ile glutatyon enejksiyonları yine daha önce belirtildiği gibi i.v.; DMSO ve rozuvastatin enjeksiyonları da i.p. olarak gerçekleştirilmiştir. Enjenksiyondan 3 saat sonra anesteziye alınarak dekapite edilen hayvanlardan beyin ve kan dokuları alınmıştır. Kanlar 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2000g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant serum olarak toplanarak analize kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Beyin örnekleri ise önce kuru buzda dondurulmuş ve -20 °C'de muhafa edilmiştir. Analiz günü striatum dokuları toplanmış, her hayvan ayrı bir şekilde analiz edilmiştir.

5.10.2. Örneklerin analize hazırlanması

5.10.2.1. Serum örneklerinin analize hazırlanması

Elde edilen serumların analize hazırlanması kısaca anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kısaca 200 µl serum örneği 50 µl internal standart ile (saf rozuvastatin) karıştırılmış ve 30 saniye vortexlenmiştir. Karışım üzerine 750 µl asetonitril eklenmiş ve 5 dakika daha vortekslenmiştir. 14.000rpm'de 5 dakika santrifüj edilen örneklerden 700 µl supernatant alınarak 40 °C'de buharlaşmaya bırakılmıştır. Örnekler tamamen kuruduktan sonra 200µl mobil fazda (metanol) çözülmüş ve yükleme tüplerine aktarılmıştır.

5.10.2.2. Striatum dokusu örneklerinin analize hazırlanması

Dokudan örnek hazırlamak için OASIS marka kit kullanılmıştır. Örneklerin hazırlanması kitin önerdiği protokol ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca; toplanan dokular hayvan başına 500 µl amonyum bikarbonat içerisinde cam homojenizatörde homojenize edilmiş, 300g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant alınmıştır.

Kit içerisinden çıkan kolonlar ilk olarak metanol ile vakum altında şartlandırılmış ve su ile dengeye getirilmiştir. Homojenizasyon sonrası sıvı faz olarak toplanan örnek dengelenen kolona yüklenmiş ve vakum minimum değerde açılarak sıvı fazın sorbent yatağına dereceli olarak geçişine izin verilmiştir. Kolona %5 metanol eklenmiş ve 30 saniye kadar vakumlanarak kalan sıvı fazın tamamının sorbent yatağına geçişi sağlanmıştır. Yatakta toplanan atık sıvı uzaklaştırıldıktan sonra toplama tüpü değiştirilmiştir. Daha sonra kolona 9:1 asetonitril:metanol (hacim:hacim) içeren organik elüsyon solventi eklenmiş ve vakum açılmaksızın solventin toplama tüpüne yer çekimi etkisi ile filtre olması beklenmiştir. Daha sonra vakum minimum kuvvette açılarak kolon filtresinde kalan solventin toplama tüpüne geçişi için beklenmiştir. Toplanan sıvı 40 °C'de buharlaşmaya bırakılmıştır. Örnekler tamamen kuruduktan sonra 200µl mobil fazda (metanol) çözülmüş ve yükleme tüplerine aktarılmıştır.

Örnekler daha sonra ilgili teknisyene teslim edilerek analize tabi tutulmuştur.

5.11. İstatistiksel Değerlendirme

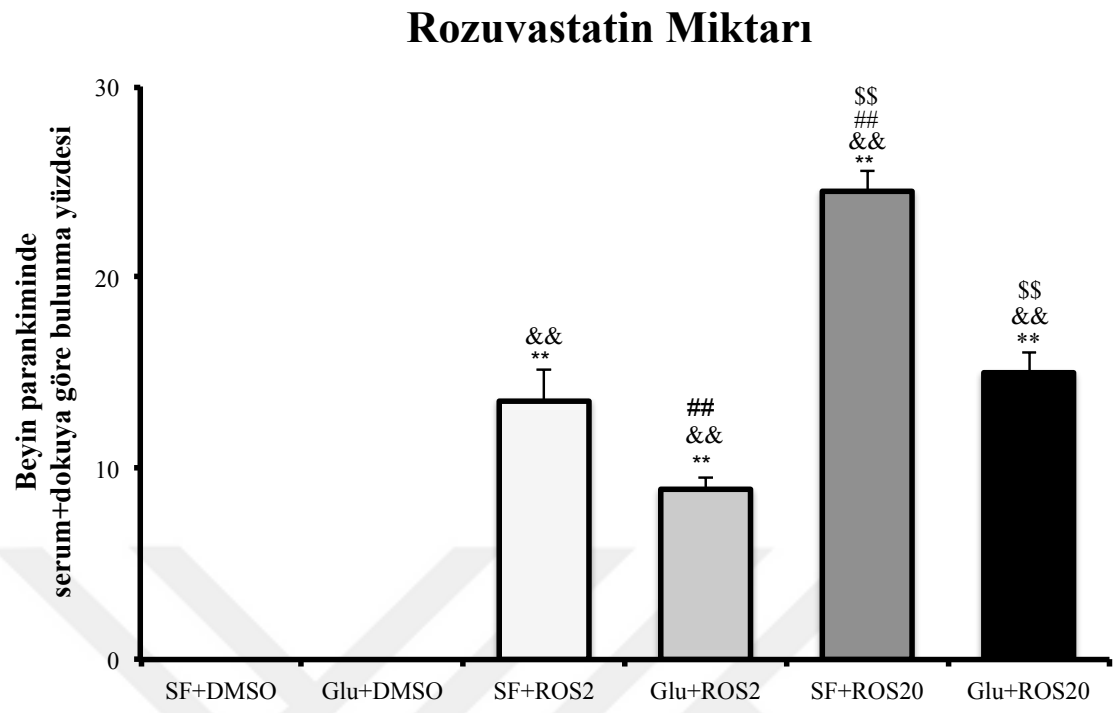
Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeye alınabilmeleri için yapılan her analiz 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistik programı olarak, SPSS ANOVA programı kullanılmıştır. Gruplar arası anlamlılığı tespit edebilmek için elde edilen değerlere, One Way ANOVA ile LSD testleri uygulanmıştır**.** $p \leq 0.5$ ve $p \leq 0.1$ değerleri sırası ile tek ve çift simgeli olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. TQ-S Cihazı ile Serum ve Dokudan Rozuvastatin Tayini

Belirtilen gruplarda enjeksiyonların gerçekleştirildiği hayvanlar enjeksiyonu takiben 3. saatlerinde sakrifiye edildi, serumları toplandı ve striatum dokuları dondurulmuş beyinden alındı. Serumdan ve dokudan geliştirilen katı faz lipit ekstraksiyon yöntemi ile izole edilen rozuvastatin miktarnın kantitasyonu TQ-S cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar yorumlanırken her gruba ait hayvandan serum ve dokuda bulunan toplam rozuvastatin miktarı hesaplandı. Bu değerden dokuda bulunan rosuvastatin miktarının yüzde çevrimleri üzerinden istatistiksel analizler yapıldı, grafikleri çizildi.

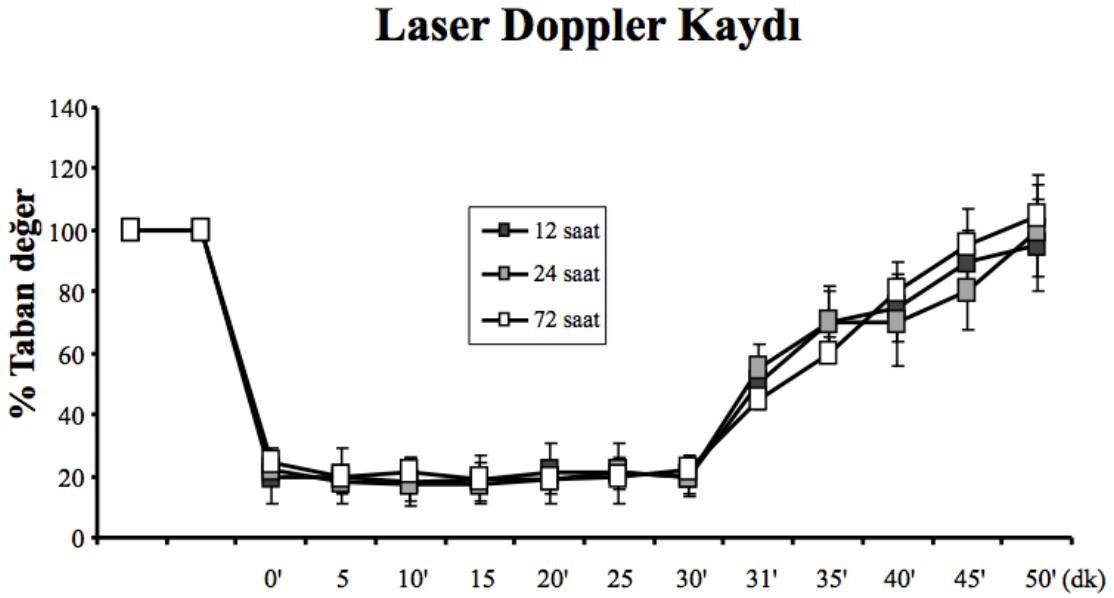
Elde edilen sonuçlara göre glutatyon, rozuvastatinin kandan beyne geçişini hem 2 mg/kg hem de 20 mg/kg rozuvastatin alan gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde engellemiştir ($p \leq 0.01$). G+ROS20 grubunda bulunan toplam rozuvastatin yüzdesinin G+ROS2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür ($p \leq 0.01$).



Şekil 6.1.1: Striatum dokusunda ilaç birikimi tayini. Veriler ortalama ±SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık ** p≤0.01 Glu+DMSO'ya göre anlamlılık && p≤0.01 SF+ROS2'ye gore anlamlılık ## p≤0.01. Glu+ROS2'ye göre anlamlılık $$p≤0.01.

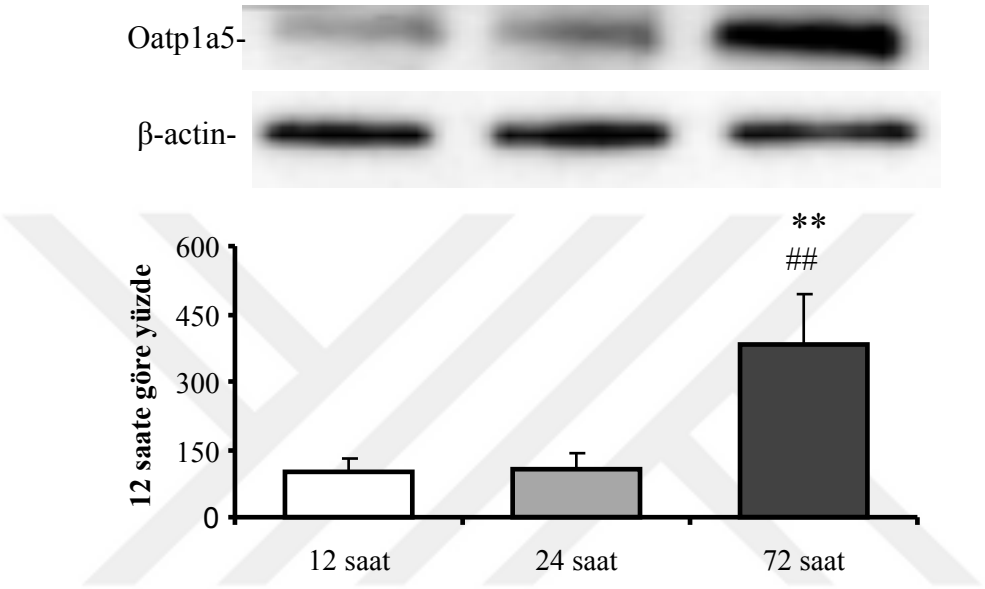
6.2. Oatp1a5'in Beyin Mikro Damar Parçacıklarında Anlatımı

Şekil 1 A grubu hayvanlarının beyin felci ve reperfüzyonun kontrolü amacıyla beyin kan akımını anlık ölçen Laser Doppler'in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, Sweden) orta serebral arter bölgesine (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direk kafatası kemiği üzerine yerleştirilerek kontrol edildi. Deney grupları arasında istatistikesel bir farklılık görülmedi. Taban değere (*baseline*) göre LDF kaydının % 15-20 arasında düşüş ve reperfüzyonla birlikte tekrar artış gözlemlendi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi.



Şekil 6.2.1: A Grubu operasyonları geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler Akım (LDF) kaydı. 12 saat, 24 saat ve 72 saat grupları.

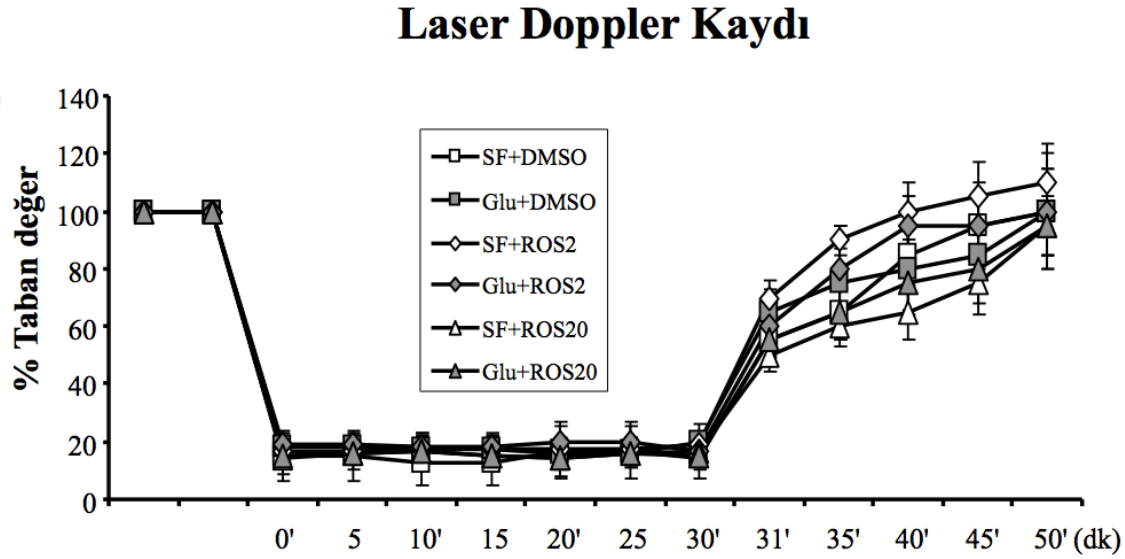
30 dakikalık OSAO sonrası belirtilen zaman diliminde sakrifiye edilen hayvanlardan beyin mikro damar parçacığı zenginleştirmesi yapıldı. Elde edilen hücrelerden protein izolasyonunu takiben Western blot analizi gerçekleştirildi. Şekil 1' de görüleceği üzere Oatp1a5'in anlatımı 12 ve 24 saatlik zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. 72 saatlik zaman diliminde, 12 ve 24 saatlik zaman dilimlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir.



Şekil 6.2.2: Oatp1a5'in mikro damar parçacıklarında zamana bağlı anlatımı. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. 12 saate göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01

6.3. İskemik Striatumda İmmünflorasan Boyamalar

B Grubu Seri 1 hayvanlarına, beyin felci ve reperfüzyonun kontrolü amacıyla beyin kan akımını anlık ölçen Laser Doppler'in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, Sweden) orta serebral arter bölgesine (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direk kafatası kemiği üzerine yerleştirilerek kontrol edildi. Deney grupları arasında istatistiksel bir farklılık görülmedi. Taban değere (*baseline*) göre LDF kaydının %15-20 arasında düşüş ve reperfüzyonla birlikte tekrar artış gözlemlendi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi.

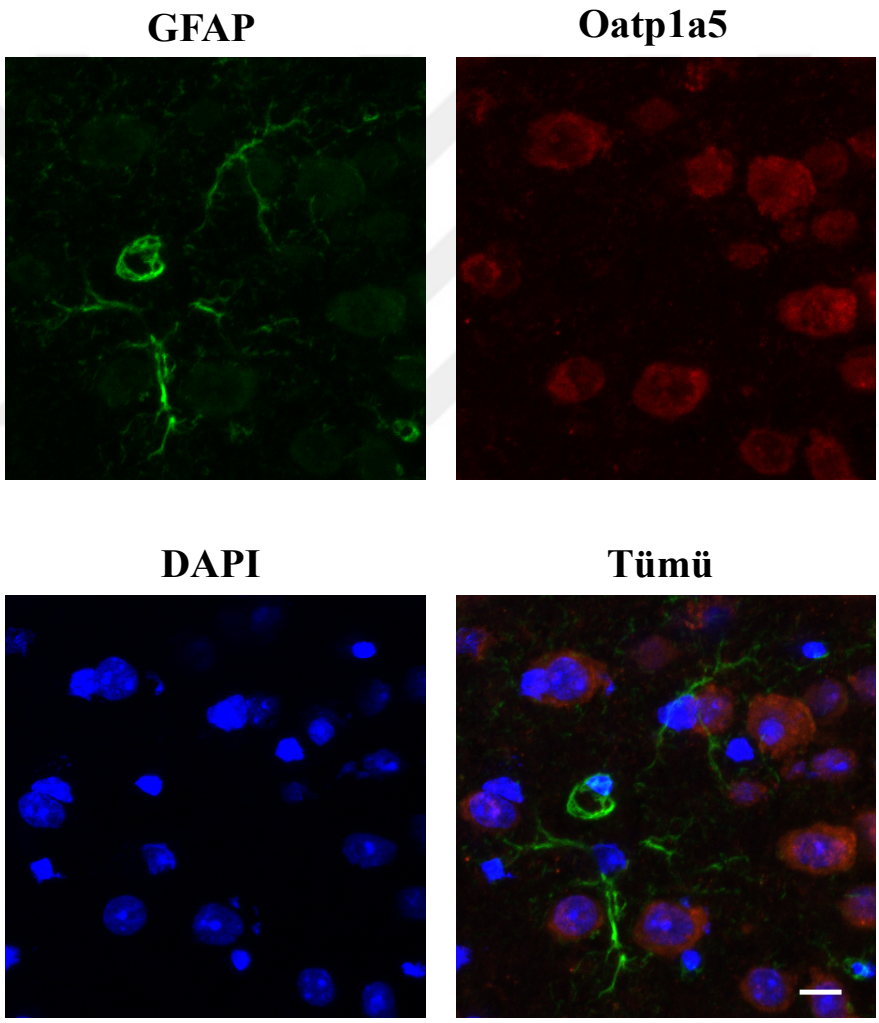


Şekil 6.3.1: B grubu Seri 1 operasyonları geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı. SF + DMSO, SF + Rosuvastatin 2 mg/kg, SF + Rosuvastatin 20 mg/kg, Glutatyon+DMSO, Glutatyo + Rosuvastatin 2mg/kg, Glutatyon + Rosuvastatin 20 mg/kg.

0.1 M PBS içinde hazırlanan % 4 PFA ile fikse edilen kesitler normal eşek serum (NDS) ile bloklandıktan sonra ilgili primer antikorlar (OATP1a5, NeuN, GFAP, CD31, Iba1) ile inkübe edilmiş ve floresan-konjuge sekonder antikorlar ile inkübasyonun ardından konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Boyanan kesitlerin görüntülenmesi ve analizi için konfokal (LSM 780; Zeiss) mikroskop kullanıldı. Boyamalardan elde edilen sonuçlar incelenmiştir.

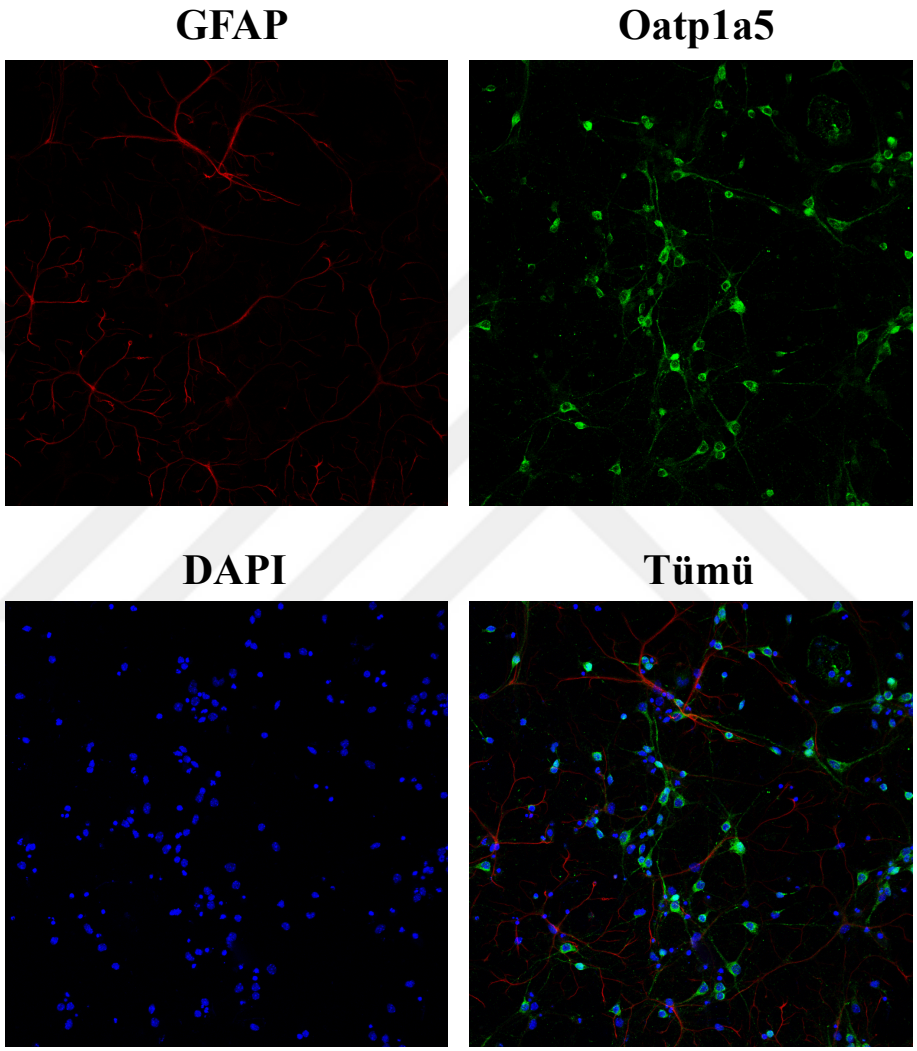
6.3.1 Oatp1a5- GFAP ikili boyaması

Astrosit hücre işaretleyicisi GFAP antikoru Oatp1a5 antikoru ile ikili olarak boyanmıştır. 488nm dalga boyunda ölçümü alınan GFAP boyaması sol üst panelde, 594 nm dalga boyunda ölçüm alınan Oatp1a5 boyaması sağ üst panelde görülmektedir. Çekirdek işaretleyicisi olarak 405 nm dalga boyunda ölçümü alınan DAPI kullanılmıştır (sol alt panelde). En son her üç laser gücünün aynı anda verilerek çekilen resimde eş lokalizasyon durumu belirlenmiştir. Oatp1a5 taşıyıcı molekülünün, astrositlerde imünflorasan boyamalar sonucunda eş lokalize olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 6.3.1.1).

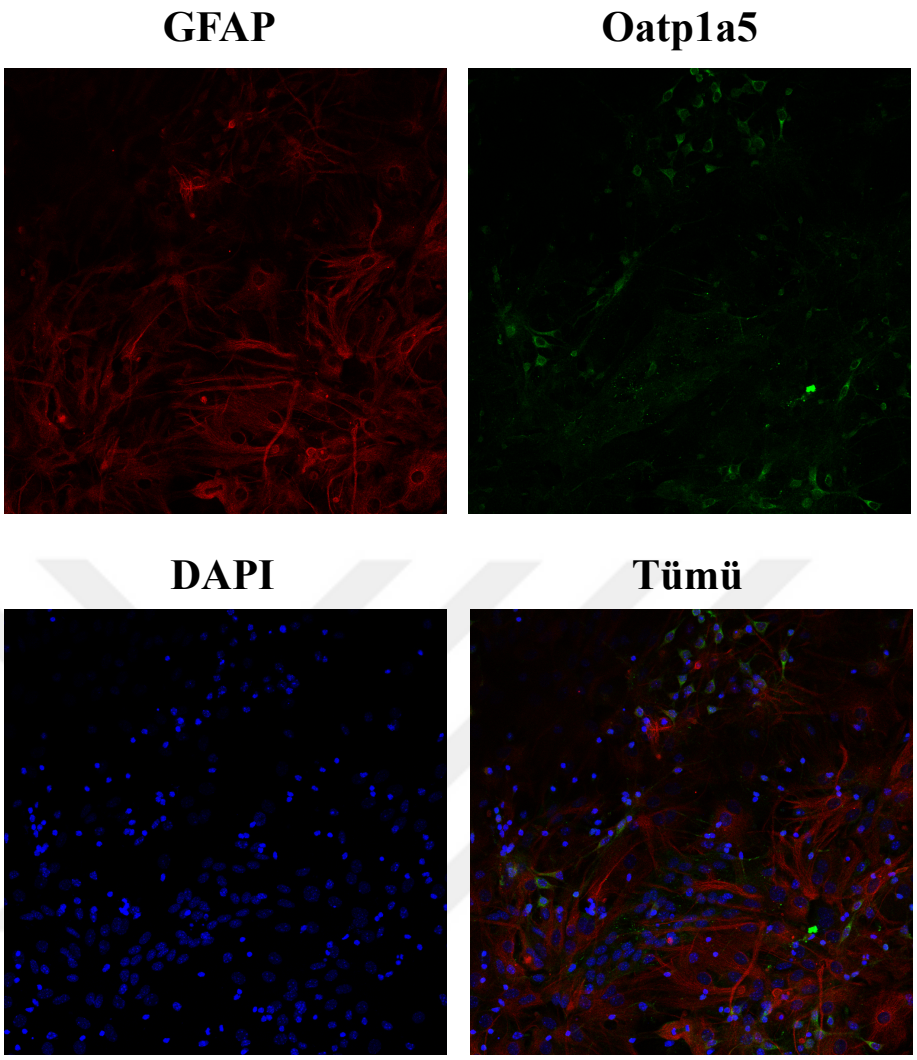


Şekil 6.3.1.1: İskemik striatumda GFAP/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının astrosit hücreleri ile eş lokalize olmadığı gözlenmiştir.

Hücre spesifik lokasyonun belirlenmesi sırasında, boyamada yaşanan doku kaynaklı problemleri aşmak amacı ile benzer boyamalar %15 oranında astrosit içeren primer kortikal nöron kültürü ve glial hücre kültürlerinde tekrarlanmıştır. Her iki kültürde de GFAP ve Oatp1a5 eş lokalizasyonu gözlenmemiştir (Şekil 6.3.1.2, şekil 6.3.1.3).



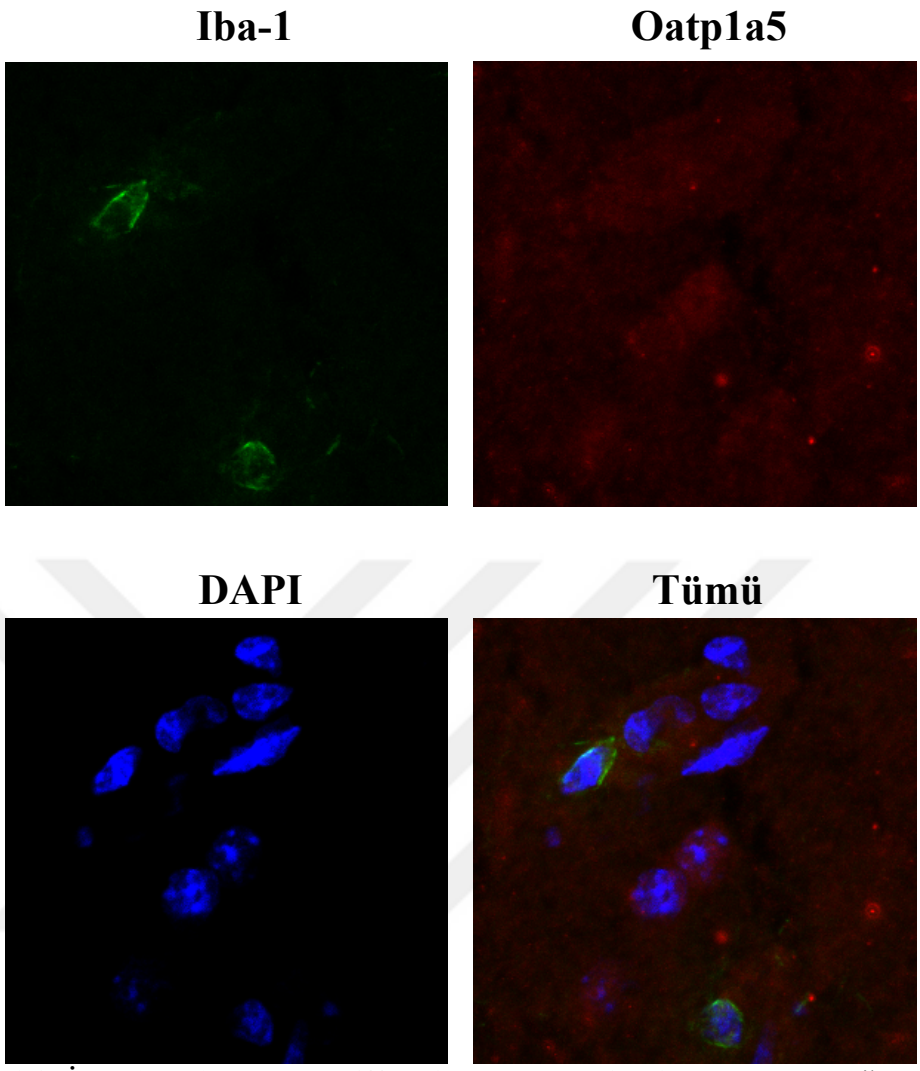
Şekil 6.3.1.2: Primer kortikal nöron kültürlerinde GFAP/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının astrosit hücreleri ile eş lokalize olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 6.3.1.3: Primer kortikal glia kültürlerinde GFAP/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının astrosit hücreleri ile eş lokalize olmadığı gözlenmiştir.

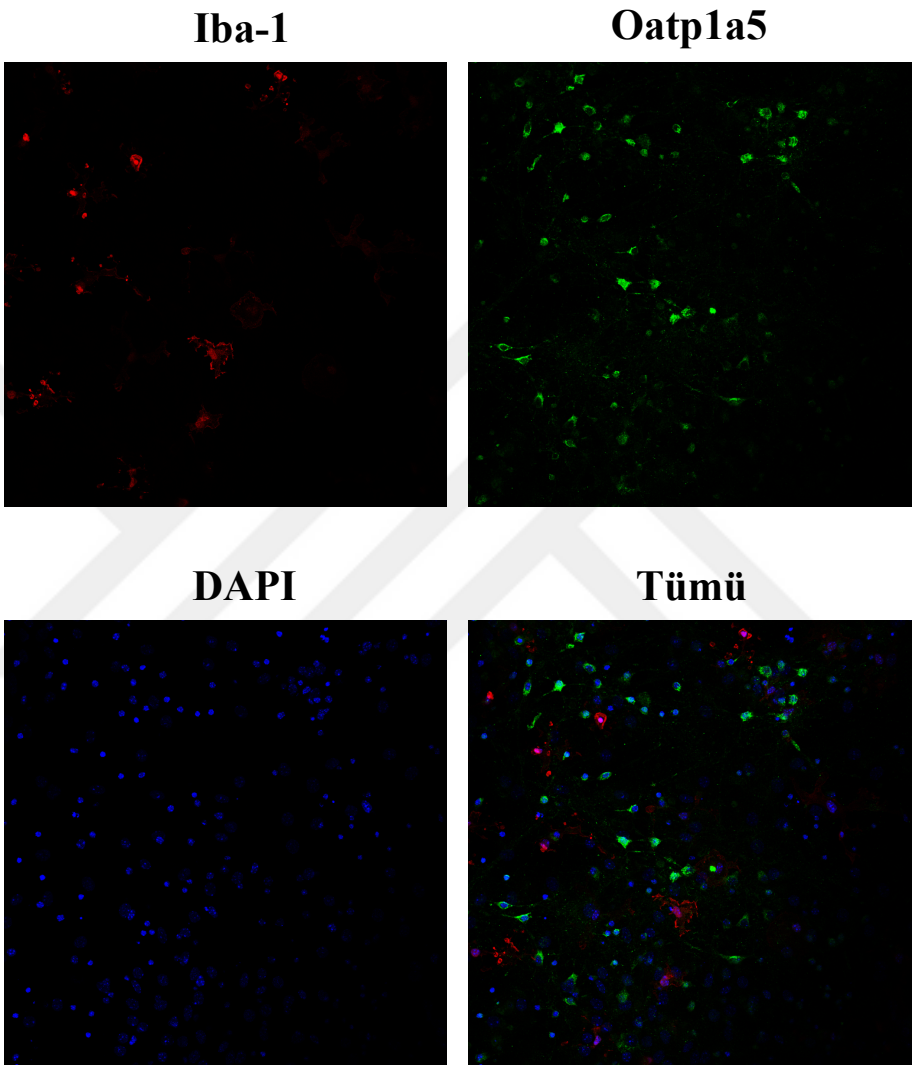
6.3.2. Oatp1a5- Iba-1 ikili boyaması

Mikroglilal hücre işaretleyicisi Iba-1 antikoru Oatp1a5 antikoru ile ikili olarak boyanmıştır. 488nm dalga boyunda ölçümü alınan Iba-1 boyaması sol üst panelde, 594 nm dalga boyunda ölçüm alınan Oatp1a5 boyaması sağ üst panelde görülmektedir. Çekirdek işaretleyicisi olarak 405 nm dalga boyunda ölçümü alınan DAPI kullanılmıştır (sol alt panelde). En son her üç laser gücünün aynı anda verilerek çekilen resimde eş lokalizasyon durumu belirlenmiştir. Oatp1a5 taşıyıcı molekülünün, mikroglial hücrelerde imünflorasan boyamalar sonucunda eş lokalize olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 6.3.2.1).



Şekil 6.3.2.1: İskemik striatumda Iba-1/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının mikroglia hücreleri ile eş lokalize olmadığı gözlenmiştir.

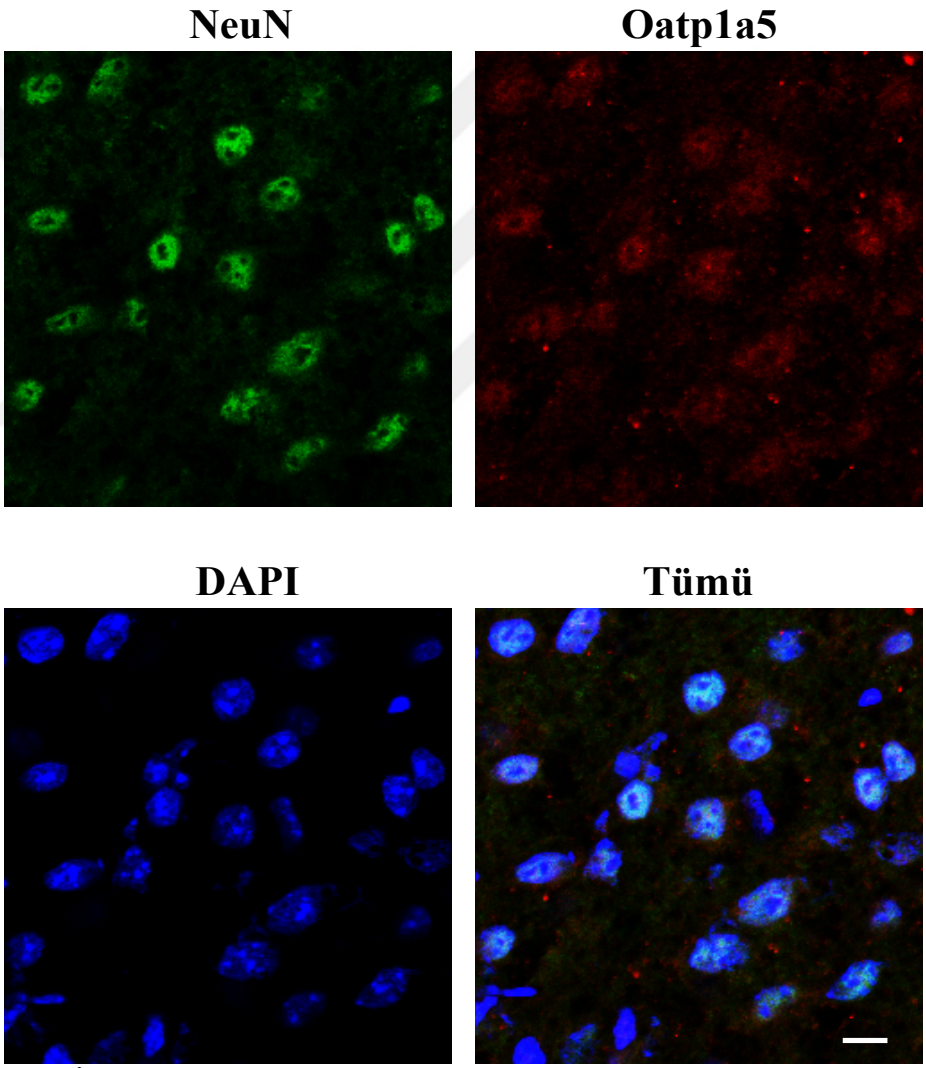
Hücre spesifik lokasyonun belirlenmesi sırasında, boyamada yaşanan doku kaynaklı problemleri aşmak amacı ile benzer boyamalar glial hücre kültürlerinde tekrarlanmıştır. Glial hücre kültürde de Iba-1 ve Oatp1a5 eş lokalizasyonu gözlenmemiştir (Şekil 6.3.2.2).



Şekil 6.3.2.2: Primer kortikal glia kültürlerinde Iba-1/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının mikroglia hücreleri ile eş lokalize olmadığı gözlenmiştir.

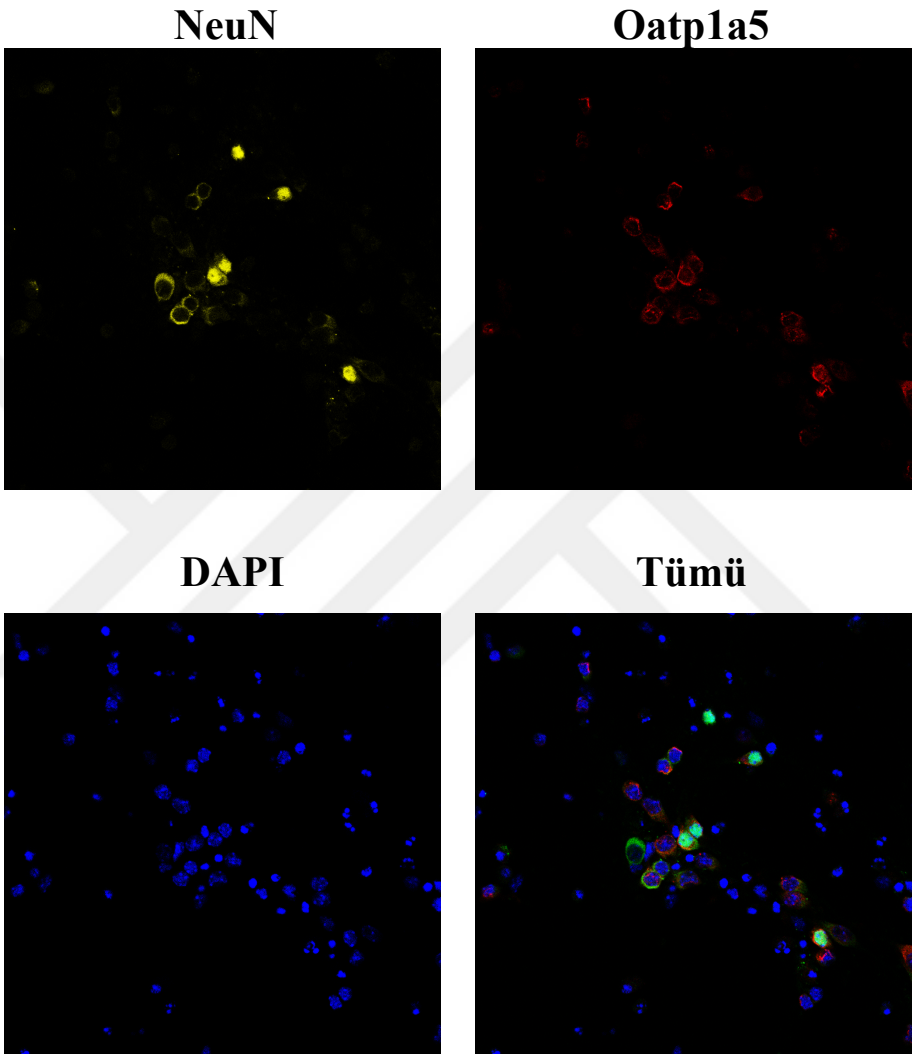
6.3.3. Oatp1a5- NeuN ikili boyaması

Nöronal çekirdek işaretleyicisi NeuN antikoru Oatp1a5 antikoru ile ikili olarak boyanmıştır. 488nm dalga boyunda ölçümü alınan NeuN boyaması sol üst panelde, 594 nm dalga boyunda ölçüm alınan Oatp1a5 boyaması sağ üst panelde görülmektedir. Çekirdek işaretleyicisi olarak 405 nm dalga boyunda ölçümü alınan DAPI kullanılmıştır (sol alt panelde). En son her üç laser gücünün aynı anda verilerek çekilen resimde eş lokalizasyon durumu belirlenmiştir. Oatp1a5 taşıyıcı molekülünün, nöronla hücrelerde imünflorasan boyamalar sonucunda eş lokalize olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.3.3.1).



Şekil 6.3.3.1: İskemik striatumda NeuN/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının nöronlar ile eş lokalize olduğu gözlenmiştir.

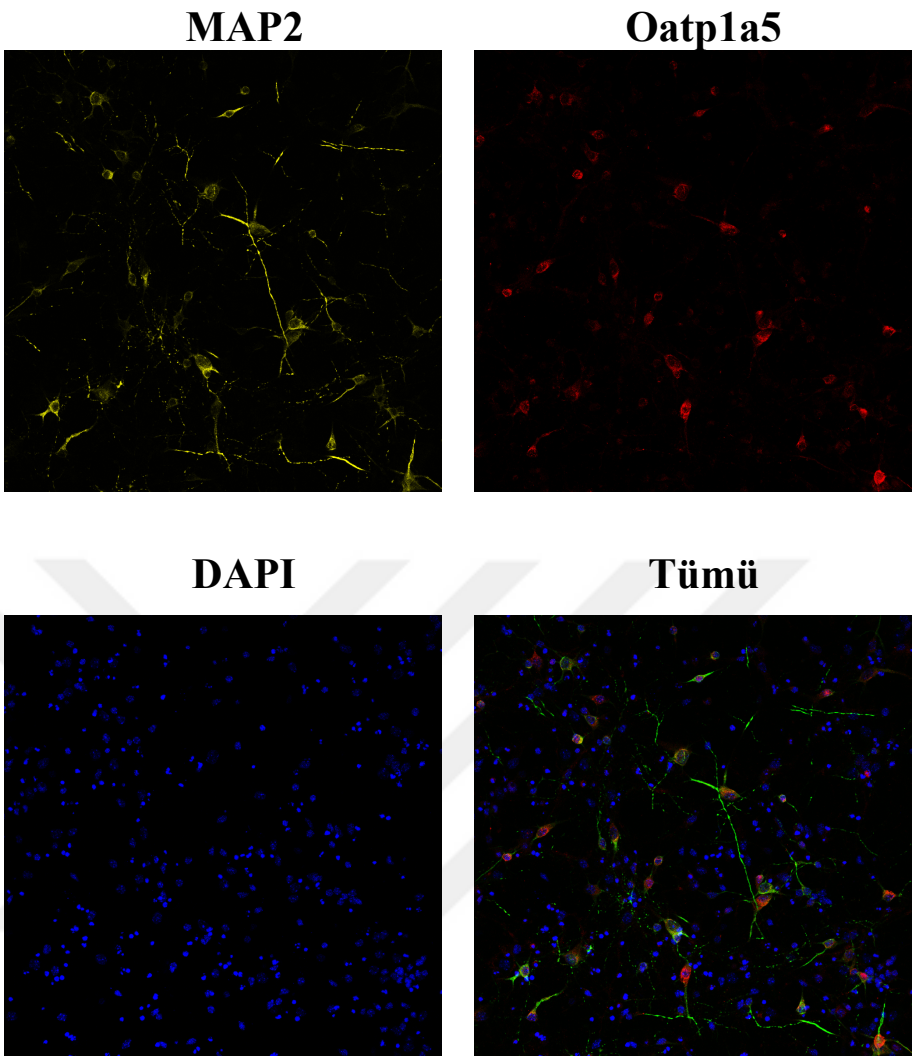
Hücre spesifik lokasyonun belirlenmesi sırasında, boyamada yaşanan doku kaynaklı problemleri aşmak amacı ile benzer boyamalar primer kortikal hücre kültürlerinde tekrarlanmıştır. Nöron kültürlerinde de NeuN ve Oatp1a5 eş lokalizasyonu gözlenmemiştir (Şekil 6.3.3.2).



Şekil 6.3.3.2: Primer kortikal nöron kültürlerinde Iba-1/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının nöronlarda eş lokalize olduğu gözlenmiştir.

6.3.4. Oatp1a5- MAP2 ikili boyaması

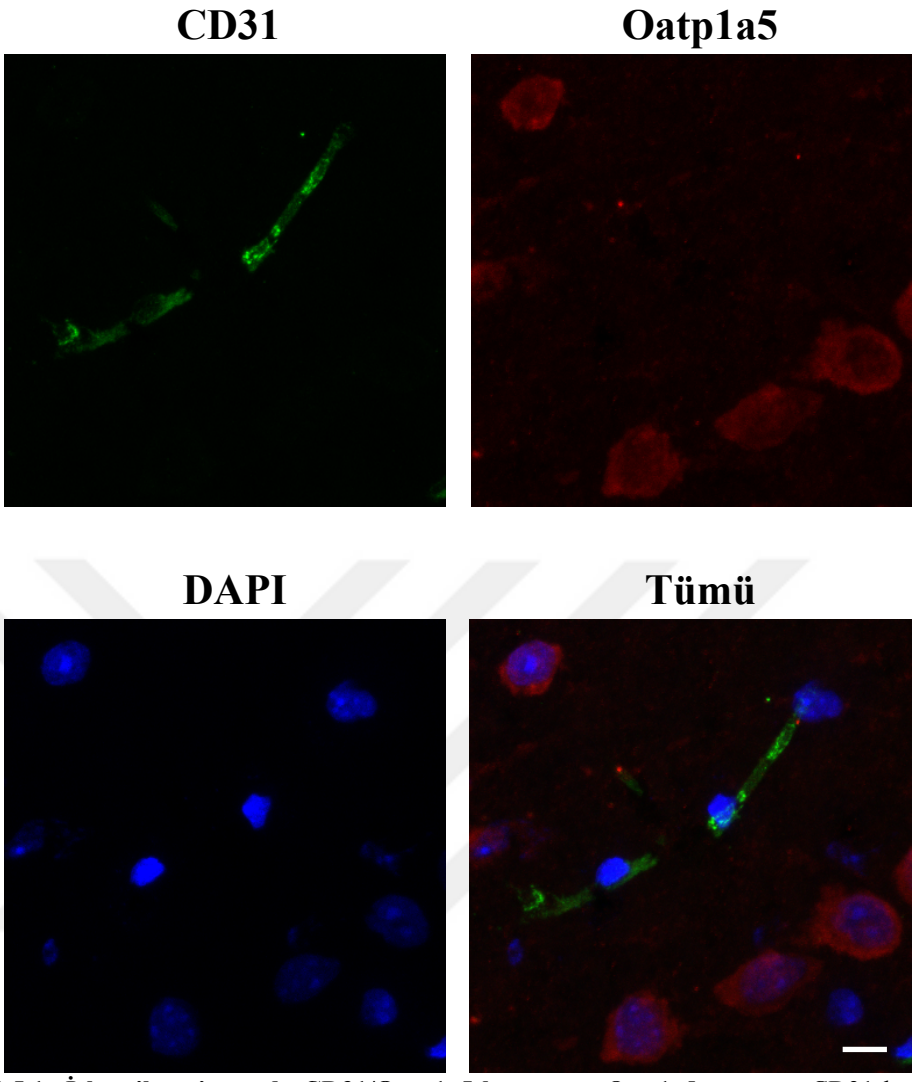
Nörona özgü lokasyonun başka bir antikor ile de gösterilmesi için dendrit işaretleyicisi MAP2 antikoru Oatp1a5 antikoru ile primer kortikal nöron hücrelerinde ikili olarak boyanmıştır. 488nm dalga boyunda ölçümü alınan MAP2 boyaması sol üst panelde, 594 nm dalga boyunda ölçüm alınan Oatp1a5 boyaması sağ üst panelde görülmektedir. Çekirdek işaretleyicisi olarak 405 nm dalga boyunda ölçümü alınan DAPI kullanılmıştır (sol alt panelde). En son her üç laser gücünün aynı anda verilerek çekilen resimde eş lokalizasyon durumu belirlenmiştir. Oatp1a5 taşıyıcı molekülünün, nöronal hücrelerde imünflorasan boyamalar sonucunda eş lokalize olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.3.4.1).



Şekil 6.3.4.1: Primer kortikal nöron kültürlerinde MAP2/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısının nöronlar ile eş lokalize olduğu gözlenmiştir.

6.3.5 Oatp1a5-CD 31 ikili boyaması

Endotel hücre işaretleyicisi CD31 antikoru Oatp1a5 antikoru ile ikili olarak boyanmıştır. 488nm dalga boyunda ölçümü alınan CD31 boyaması sol üst panelde, 594 nm dalga boyunda ölçüm alınan Oatp1a5 boyaması sağ üst panelde görülmektedir. Çekirdek işaretleyicisi olarak 405 nm dalga boyunda ölçümü alınan DAPI kullanılmıştır (sol alt panelde). En son her üç laser gücünün aynı anda verilerek çekilen resimde eş lokalizasyon durumu belirlenmiştir. Oatp1a5 taşıyıcı molekülünün, endotel hücrelerde imünflorasan boyamalar sonucunda oldukça az bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.3.5.1).



Şekil 6.3.5.1: İskemik striatumda CD31/Oatp1a5 boyaması. Oatp1a5 taşıyıcısı CD31 hücreleri ile eş lokalize gözlenmemiştir.

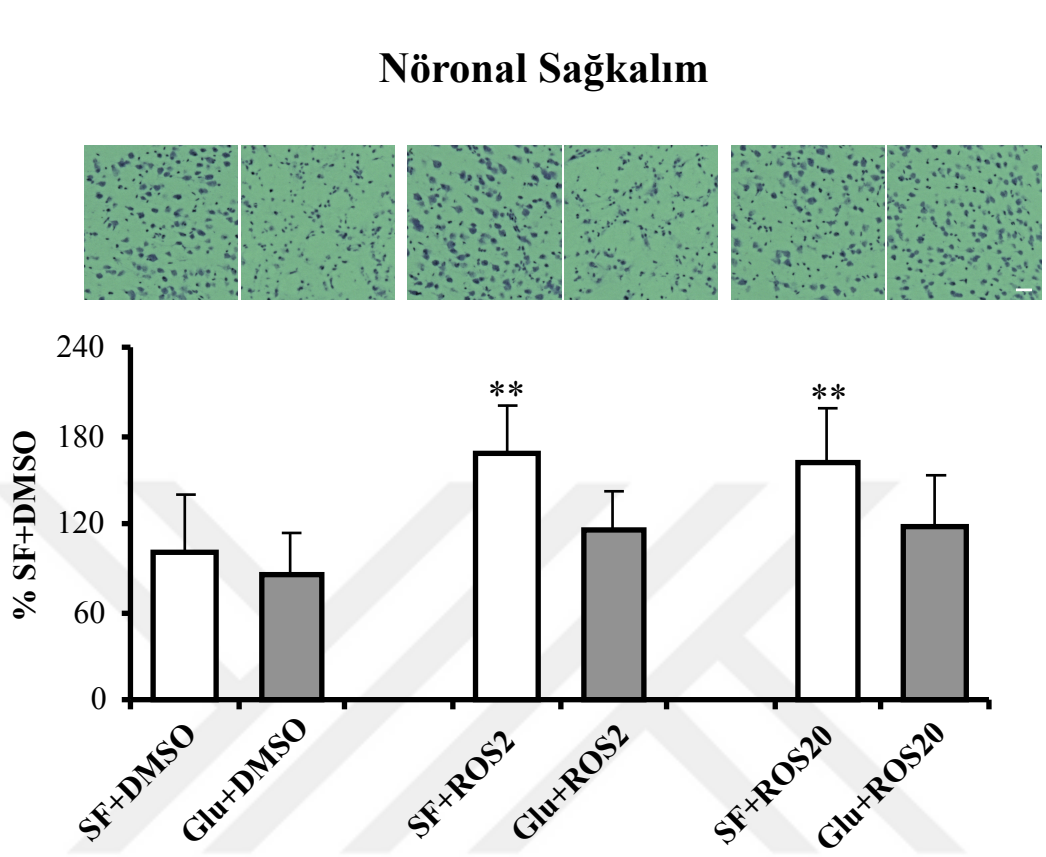
6.4. Nöronal Sağ Kalımın Değerlendirilmesi

Şekil 1 de açıklanan B grubundaki Seri 1 operasyonları geçirmiş hayvanlar 72. saatte sakrifiye edilmiştir. Striatum seviyesinden alınan kesitlere Cresyl Violet boyaması yapılmış ve hem iskemik hem de iskemik olamayan hemisferin striatumlarından 12 bölgeden hücre sayımı yapılmıştır. İskemik olmayan hemisfere göre canlılık yüzdesi hesaplanan gruplara istatistiksel analizler yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; glutatyon uygulanması kontrole göre canlılığın düşmesine anlamlı bir etki göstermemiştir. 2 mg/kg rozuvastatin grubunda; hem araç hem de glutatyon gruplarına göre nöronal sağ kalım istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır ($p \leq 0.01$).

2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda araç ve glutatyon gruplarına kıyasla nöronal sağ kalımda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. 2 mg/kg rozuvastatin grubuna göre kıyaslandığında 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon uygulanan grupta ise nöronal sağ kalımda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir ($p \leq 0.01$).

20 mg/kg rozuvastatin grubunda araç ve glutatyon gruplarına göre nöronal hayatta kalımda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0.01$). Rozuvastatin 20 mg/kg + glutatyon grubu ile rozuvastatin 20 mg/kg grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir.Son olarak; rozuvastatin 20 mg /kg + glutatyon grubunda nöronal hayatta kalım açısından rozuvastatin 2 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.2.2).



Şekil 6.4.1: B grubu Seri 1 operasyonları geçiren hayvanların nöronal sağ kalım analizleri. Veriler ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2'ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20'ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

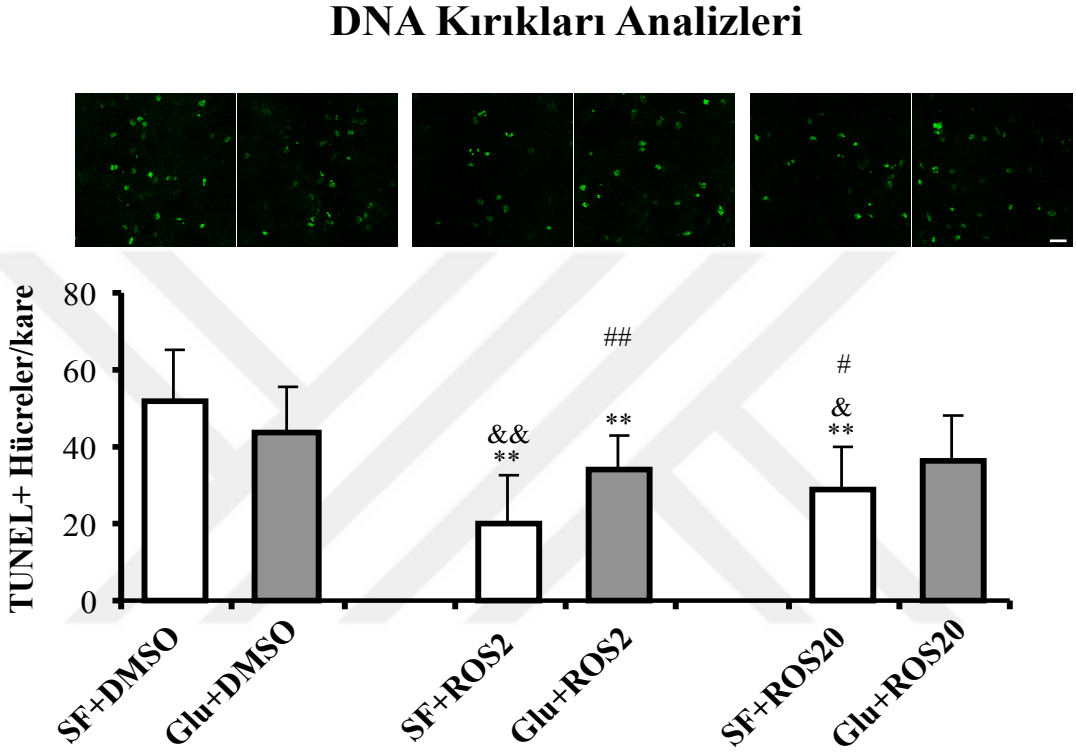
6.5. DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi

Şekil 1 de açıklanan B grubundaki Seri 1 operasyonları geçirmiş hayvanlar 72. saatte sakrifiye edilmiştir. Striatum seviyesinden alınan kesitlere TUNEL boyaması yapılmış ve iskemik olamayan striatumdan 12 bölgeden hücre sayımı yapılmıştır. Araç + araç grubuna göre apoptotik hücre yüzdesi hesaplanan gruplara istatistiksel analizler yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; glutatyon uygulaması iskemik hemisferdeki apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. 2mg/kg rozuvastatin grubunda hem araç hem de glutatyon gruplarına göre TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir ($p \leq 0.01$).

2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda araç grubuna kıyasla iskemik striatumdaki TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir ($p \leq 0.05$). Glutatyon grubu ile kıyaslandığında ise istatiksel anlamda bir fark görülmemektedir. Yine 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon uygulanan grup, 2 mg/kg rozuvastatin grubuyla kıyaslandığında TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir ($p \leq 0.01$).

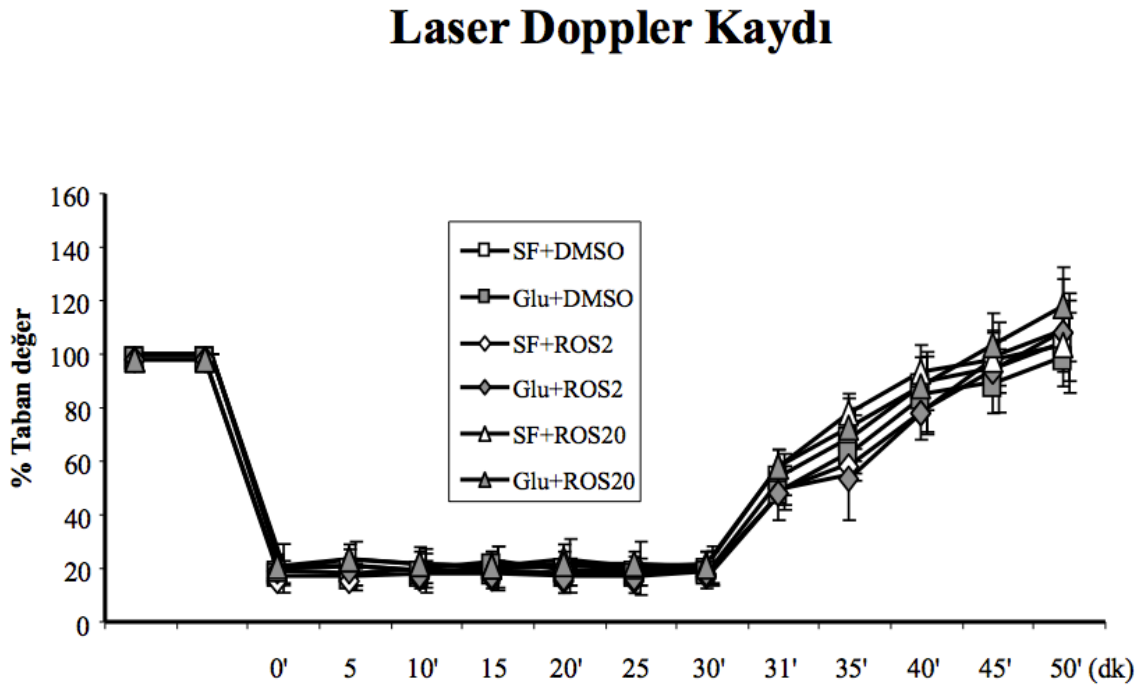
20 mg/kg rozuvastatin dozu uygulanan grupta hem araç hem de glutatyon grupların ile kıyaslandığında iskemik striatumdaki apoptotik hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş göstermiştir (sırası ile $p \leq 0.01$ ve $p \leq 0.05$). 2 mg/kg rozuvastatin veya 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon gruplarına kıyasla araarında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. 20 mg/kg rozuvastatin+glutatyon grubunda ise iskemik hemisferdeki apoptotik hücre sayısı bakımından kıyaslandığında; araç grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gerçekleşmiş ($p \leq 0.05$), glutatyon grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Yine 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubu 2 mg/kg rozuvastatin grubu ile kıyaslandığında, TUNEL pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir.



Şekil 6.5.1: B grubu Seri 1 operasyonları geçiren hayvanların DNA kırıkları analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2'ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01

6.6. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

B Grubu Seri 2 hayvanlarına, beyin felci ve reperfüzyonun kontrolü amacıyla beyin kan akımını anlık ölçen Laser Doppler'in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, Sweden) orta serebral arter bölgesine (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direk kafatası kemiği üzerine yerleştirilerek kontrol edildi. Deney grupları arasında istatistikesel bir farklılık görülmedi. Taban değere (*baseline*) göre LDF kaydının %15-20 arasında düşüş ve reperfüzyonla birlikte tekrar artış gözlemlendi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi.



Şekil 6.6.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı. SF +DMSO (A), SF + Rosuvastatin 2mg/kg (B), SF + Rosuvastatin 20 mg/kg (C), Glutatyon+DMSO (D), Glutatyo + Rosuvastatin 2mg/kg (E), Glutatyon + Rosuvastatin 20 mg/kg (F).

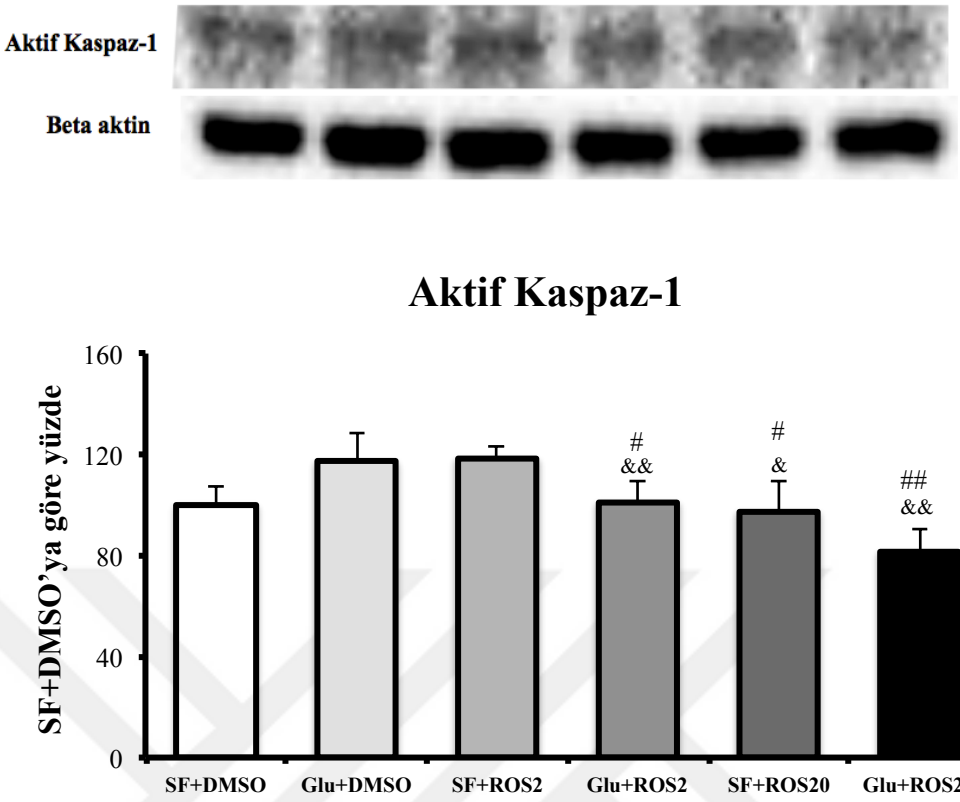
Şekil 1 de açıklanan B grubu Seri 2 deki operasyonları geçiren hayvanların striatum seviyelerinden doku örnekleri alınarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından daha önce belirtilen 6 farklı gruba ait bu dokularda protein seviyesindeki değişimleri tespit etmek amacıyla hedeflenen proteinlerin analizlerine başlanmıştır. Sırasıyla apoptotik- antiapoptotik, stres ve enflamatuvar sinyal yolaklarında görevleri

bilinen proteinlerden; Caspase-1, -3, -8 ve -9, Bax, Bcl-xL proteinlerinin seviyelerindeki değişiklikler ile p-JNK, p-p21 ve p-p38 proteinlerinin fosforlanmalarındaki artışın değerlendiğilmesi içimn Western blot analizleri yapıldı.

6.6.1. Aktif kazpaz-1 proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre Glu+DMSO grubunda SF+DMSO grubuna göre aktif kazpaz-1 proteini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). 2 mg/kg rozuvastatin grubunda araç grubuna göre aktif kazpaz-1 proteini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). 2mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise hem Glu+DMSO hem de 2 mg/kg rozuvastatin gruplarına göre aktif kazpaz-1 protein seviyesi anlamlı derece azalmıştır ($p \leq 0.05$).

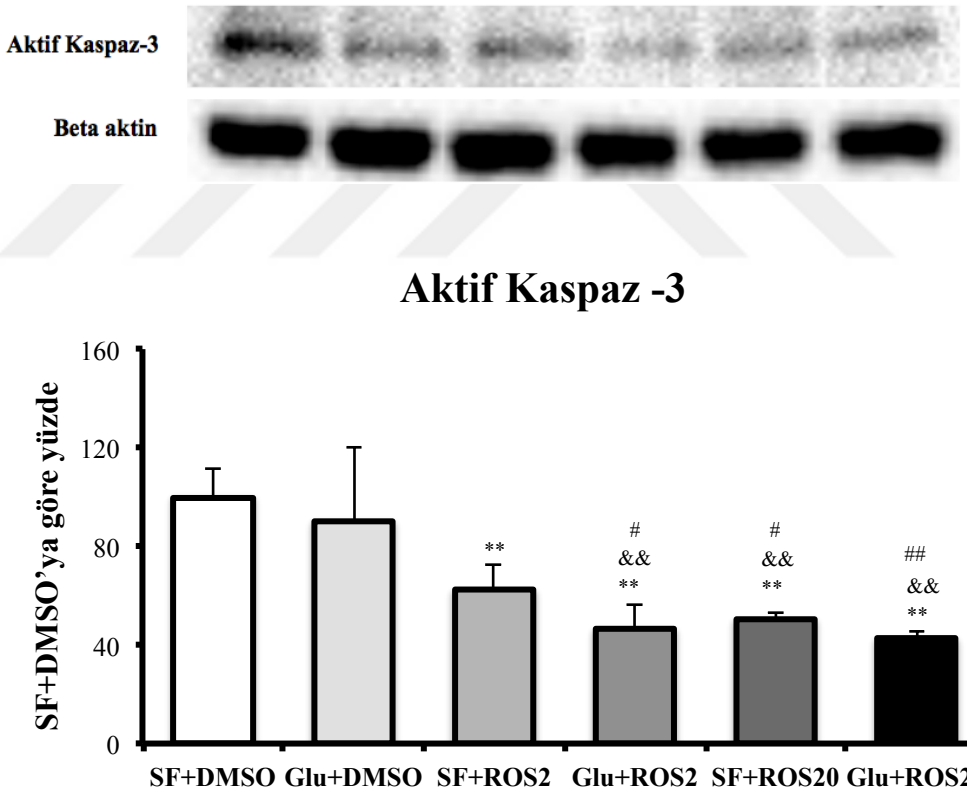
20 mg/kg rozuvastatin grubu Glu+DMSO ve 2 mg/kg rozuvastatin grupları ile karşılaştırıldığında aktif kazpaz-1 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p \leq 0.05$). 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise SF+DMSO ve Glu+DMSO grupları ile kıyaslandığında aktif kazpaz-1 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırası ile $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$).



Şekil 6.6.1.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kazpaz-1 proteini Western blot analizleri. Datalar mean+SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO' ya göre anlamlılık § p≤0.05 §§ p≤0.01. SF+ROS2'ye gore anlamlılık # p<0.05 ve ## p≤0.01

6.6.2. Aktif kazpaz-3 proteini Western blot değerlendirmesi

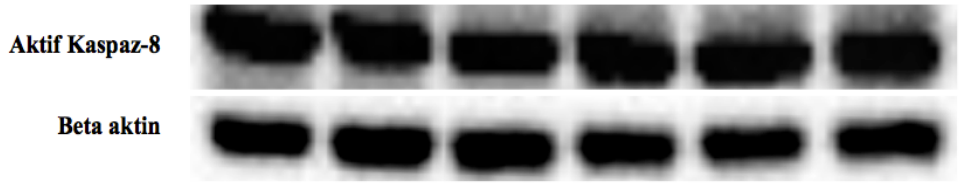
Elde edilen sonuçalara göre; SF+DMSO ve Glu+DMSO grupları arasında aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemektedir. 2 mg/kg rozuvastatin, 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon, 20 mg/kg rozuvastatin ve 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon gruplarında SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir ($p \leq 0.01$). Benzer şekilde aynı gruplar (2 mg/kg rozuvastatin, 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon, 20 mg/kg rozuvastatin ve 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon) Glu+DMSO grubu ile kıyaslandığında aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmektedir ($p \leq 0.01$). Kalan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemektedir.

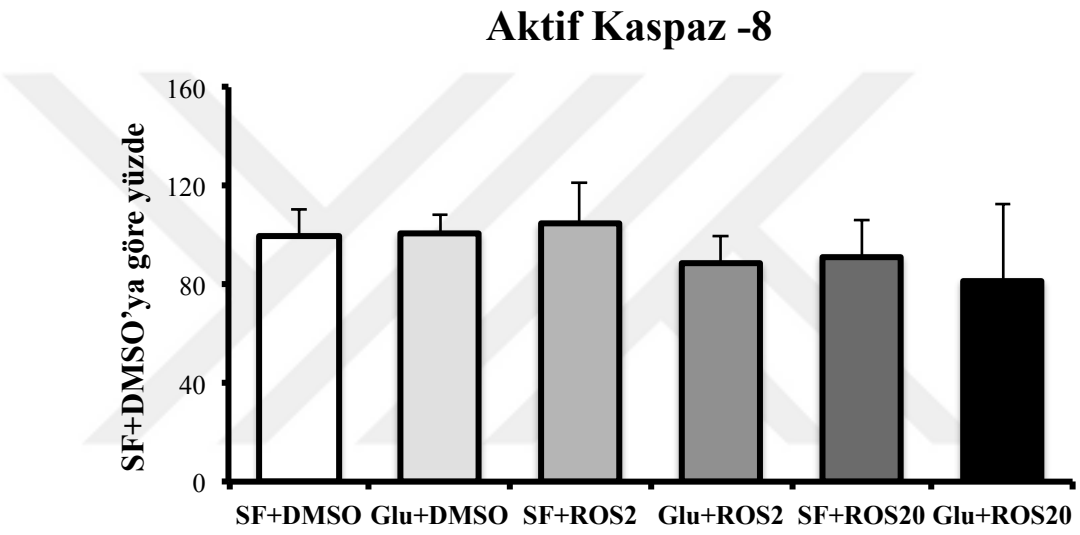


Şekil 6.6.2.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kazpaz-1 proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * $p<0.05$ ** $p<0.01$, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık § $p<0.05$ §§ $p<0.01$. SF+ROS2'ye gore anlamlılık # $p<0.05$ ve ## $p<0.01$.

6.6.3. Aktif kazpaz-8 proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre aktif kaspaz-8 protein seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir.





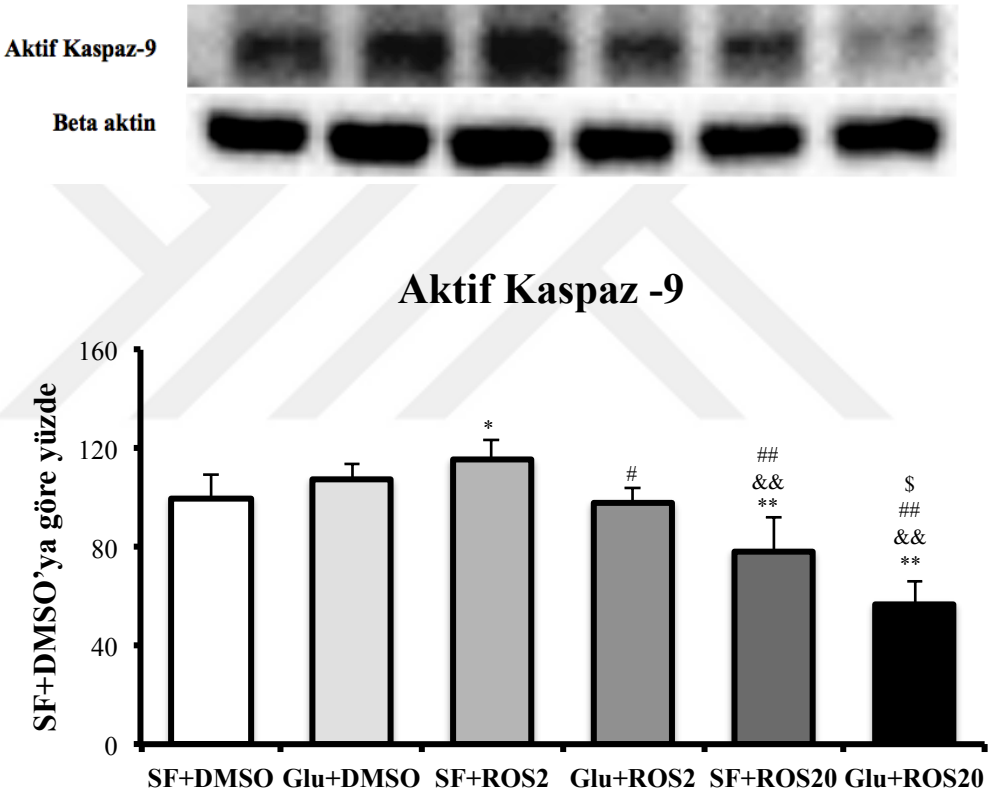
Şekil 6.6.3.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-8 proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir.

6.6.4. Aktif kazpaz-9 proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçalara göre; SF+DMSO ve Glu+DMSO grupları arasında aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemektedir. 2 mg/kg rozuvastatin grubunda SF+DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gerçekleşmiştir ($p \leq 0.05$). 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise 2 mg/kg

rozuvastatin grubuna göre aktif kaspaz-3 proteini seviyesinde istatiksel olarak anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir (p≤0.05).

20 mg/kg rozuvastatin grubunda; SF+DMSO, Glu+DMSO ve 2 mg/kg rozuvastatin gruplarının her üçüne de kıyasla aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (p≤0.01). 20mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise yine; SF+DMSO, Glu+DMSO ve 2 mg/kg rozuvastatin gruplarının her üçüne de kıyasla aktif kaspaz-3 proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (p≤0.01).

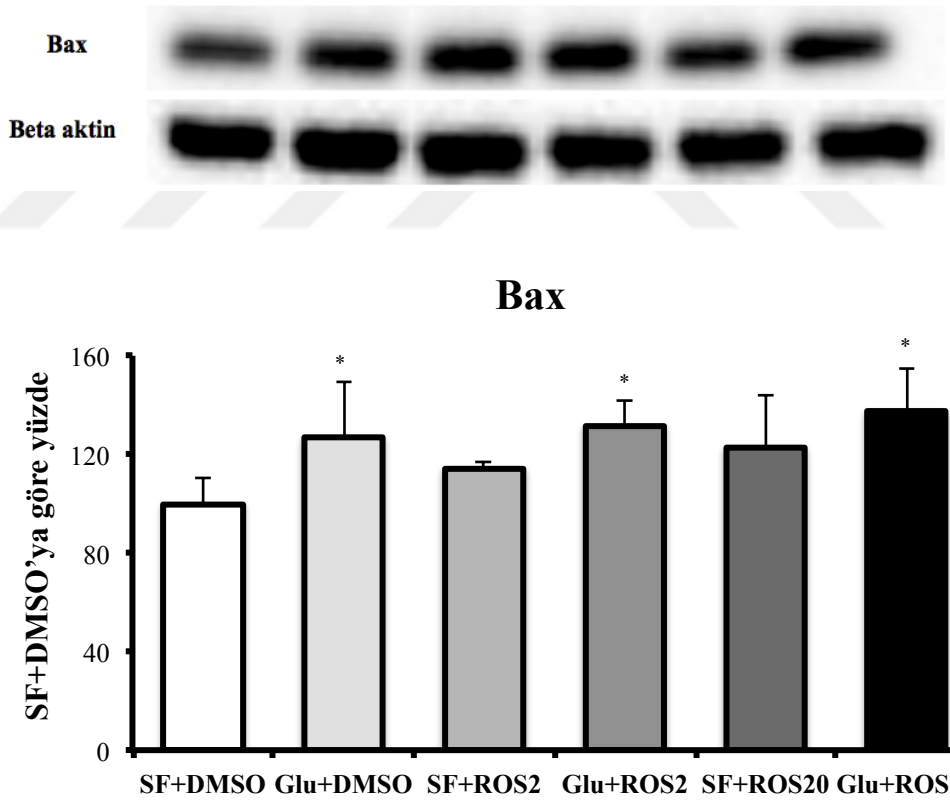


Şekil 6.6.4.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların aktif kaspaz-9 proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık § p≤0.05 §§ p≤0.01. SF+ROS2'ye gore anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01, SF+ROS20'ye göre anlamlılık $ p≤0.05 $$ p≤0.01.

6.6.5. Bax proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında Glu+DMSO grubunda Bax proteinin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). 2 mg/kg rozuvastatin grubu ile başka herhangi bir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında Bax proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).

20 mg/kg rozuvastatin grubu ile başka herhangi bir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında Bax proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).

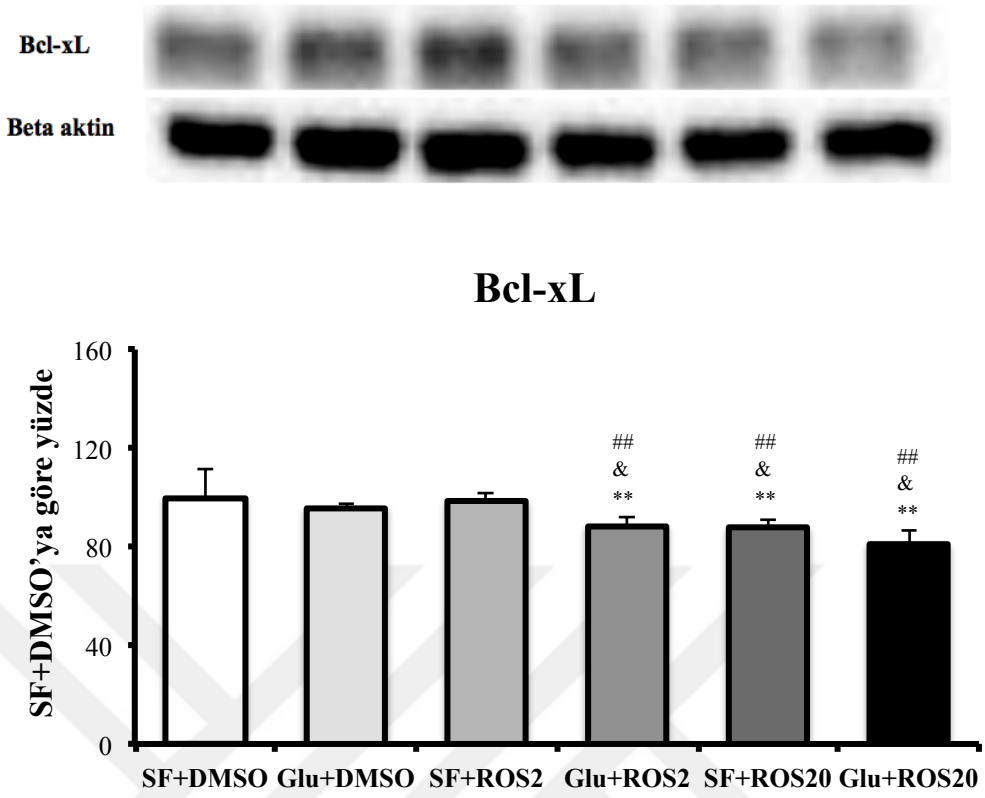


Şekil 6.6.5.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların Bax proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

6.6.6. Bcl-xL proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında Glu+DMSO, ve 2 mg/kg rozuvastatin gruplarında Bcl-xL proteininin seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında Bcl-xL proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p \leq 0.01$). Diğer yandan 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubu Glu+DMSO grubu ve 2 mg/kg rozuvastatin grupları ile kıyaslandığında Bcl-xL proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırası ile $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$)) .

20 mg/kg rozuvastatin grubu; SF+DMSO, Glu+DMSO ve 2 mg/kg rozuvastatin grupları ile karşılaştırıldığında Bcl-xL proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (sırası ile $p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$). 20 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda ise; SF+DMSO, Glu+DMSO ve 20 mg/kg rozuvastatin grupları ile kıyaslandığında Bcl-xL proteini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırası ile $p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$).

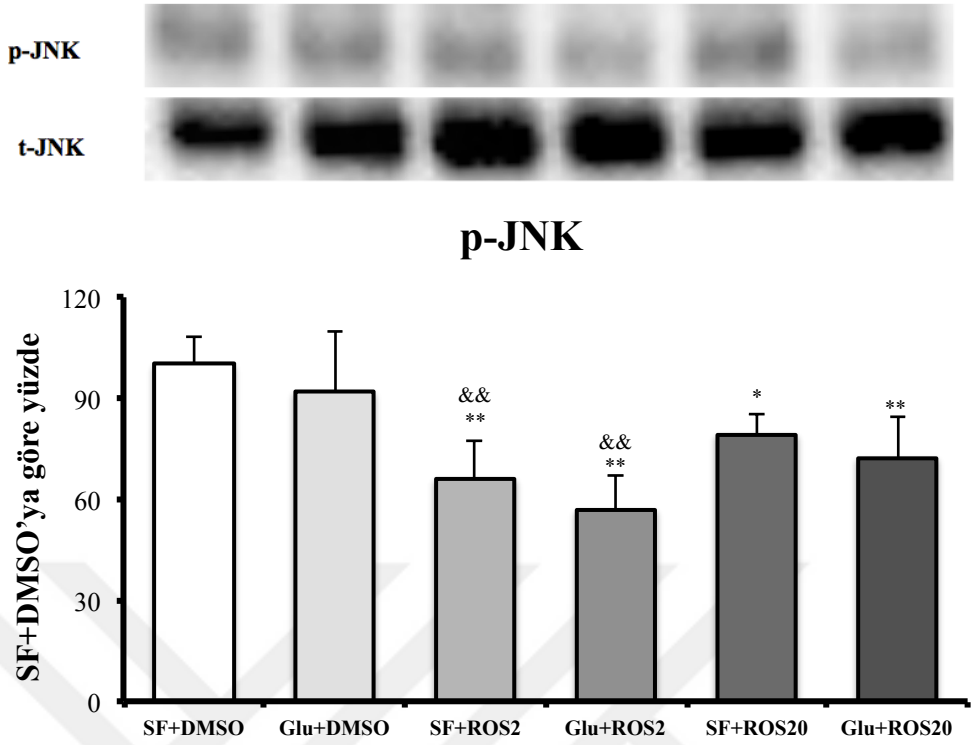


Şekil 6.6.6.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların Bcl-xL proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO ya göre anlamlılık § p≤0.05 §§ p≤0.01. SF+ROS2'ye gore anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01

6.6.7. p-JNK proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre; glutatyon uygulaması SF+DMSO grubu ile kıyaslandığında p-JNK seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmamıştır. 2 mg/kg rozuvastatin grubunda p-JNK seviyesi açısından hem SF+DMSO hem de Glu+DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (p≤0.01). 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda da yine hem araç hem de Glu+DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (p≤0.01). Bununla birlikte 2 mg/kg rozuvastatin grubu ile 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubu arasında p-JNK seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

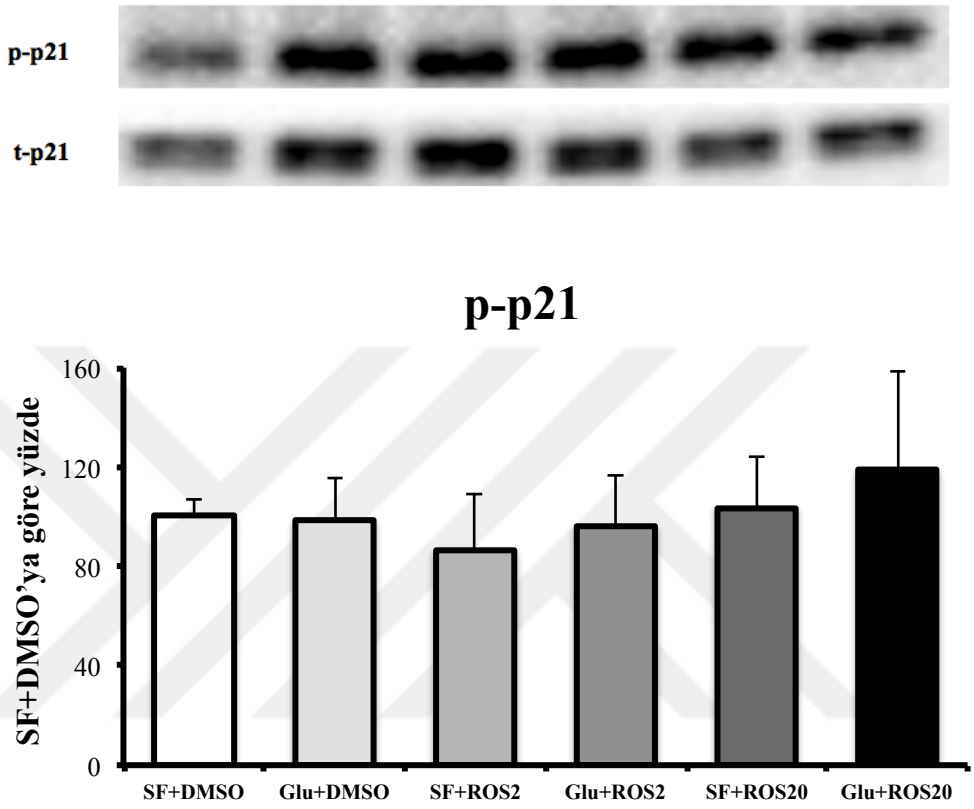
20 mg/kg rozuvastatin grubu p-JNK seviyesi açısından SF+DMSO ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermekle birlikte ($p \leq 0.05$), Glu+DMSO grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. 20mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubu SF+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında p-JNK seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p \leq 0.01$). Belirtilen gruplar dışında p-JNK değerleri açısından diğer gruplar istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemişlerdir.



Şekil 6.6.7.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-JNK proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO' ya göre anlamlılık § p≤0.05 §§ p≤0.01.

6.6.8. p-p21 proteini Western blot değerlendirmesi

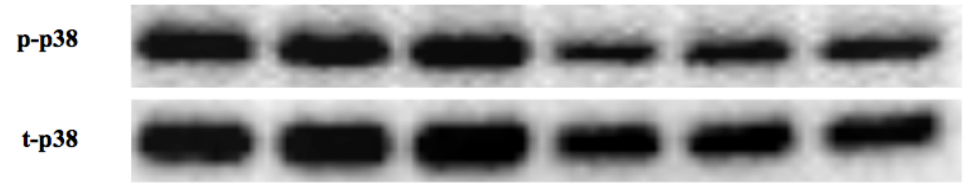
Elde edilen sonuçlara göre p-p21 protein seviyesinde grupla arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir.

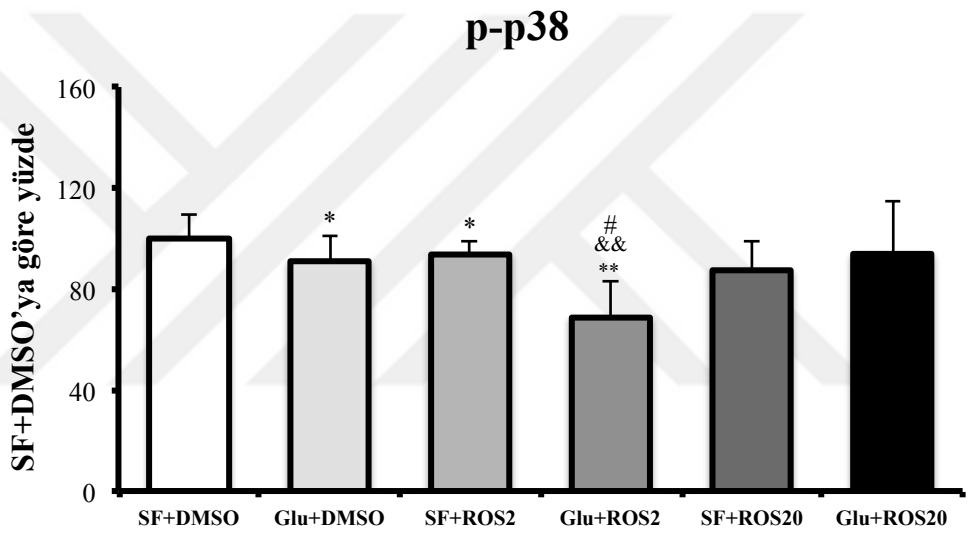


Şekil 6.6.8.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-p21 proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir.

6.6.9. p-p38 proteini Western blot değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlara göre 2 mg/kg rozuvastatin + glutatyon grubunda p-p38 seviyesinde; SF+DMSO, Glu+DMSO ve 2 mg/kg rozuvastatin gruplarının hepsine kıyasla anlamlı derecede azalma gerçekleşmiştir (p≤0.01, p≤0.01 ve p≤0.05).

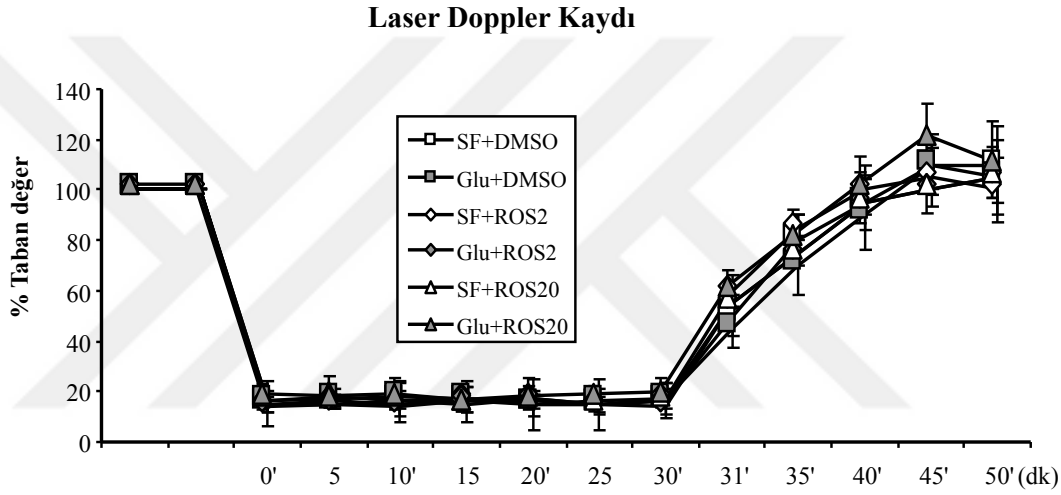




Şekil 6.6.9.1: B grubu Seri 2 operasyonları geçiren hayvanların p-p38 proteini Western blot analizleri. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık § p≤0.05 §§ p≤0.01. SF+ROS2'ye gore anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01

6.7. mRNA Analizleri ile Enflamasyon ve Damarlaşmayla İlgili Genlerin Anlatım Analizi

B Grubu Seri 3 hayvanlarına, beyin felci ve reperfüzyonun kontrolü amacıyla beyin kan akımını anlık ölçen Laser Doppler'in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, Sweden) orta serebral arter bölgesine (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direk kafatası kemiği üzerine yerleştirilerek kontrol edildi. Deney grupları arasında istatistikesel bir farklılık görülmedi. Taban değere (*baseline*) göre LDF kaydının %15-20 arasında düşüş ve reperfüzyonla birlikte tekrar artış gözlemlendi. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi.

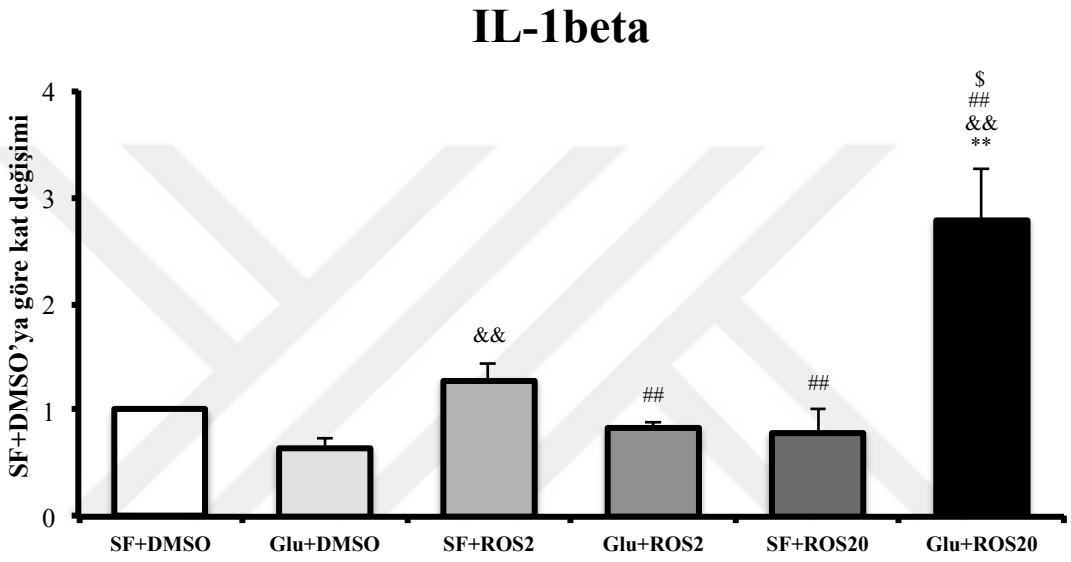


Şekil 6.7.1: B grubu Seri 3 operasyonları geçiren hayvanların orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı. SF +DMSO (A), SF + Rosuvastatin 2mg/kg (B), SF + Rosuvastatin 20 mg/kg (C), Glutatyon+DMSO (D), Glutatyo + Rosuvastatin 2mg/kg (E), Glutatyon + Rosuvastatin 20 mg/kg (F).

Gen ekspresyon çalışmaları için, B grubu seri 3 operasyonunu geçiren hayvanlar iskemiden 72 saat sonra sakrifiye edildi. Beyinlerden kuru buz üzerinde bregmadan 2 mm kaudal ve 2 mm rostral bloklar halinde kesitler alındı. Bu bloklardan striatum bölgesinden toplanan doku örnekleri RNA izolasyonuna kadar -80°C de saklanmıştır. RNA izolasyonu için alınan ve -80°C de saklanan beyin dokularından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR gen ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Anti-inflamatuvar etkili genler (IL1β, TNFα, TGFβ), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9) olmak üzere toplam 6 gen ile çalışıldı.

6.7.1. IL-1 beta'nın mRNA analizi

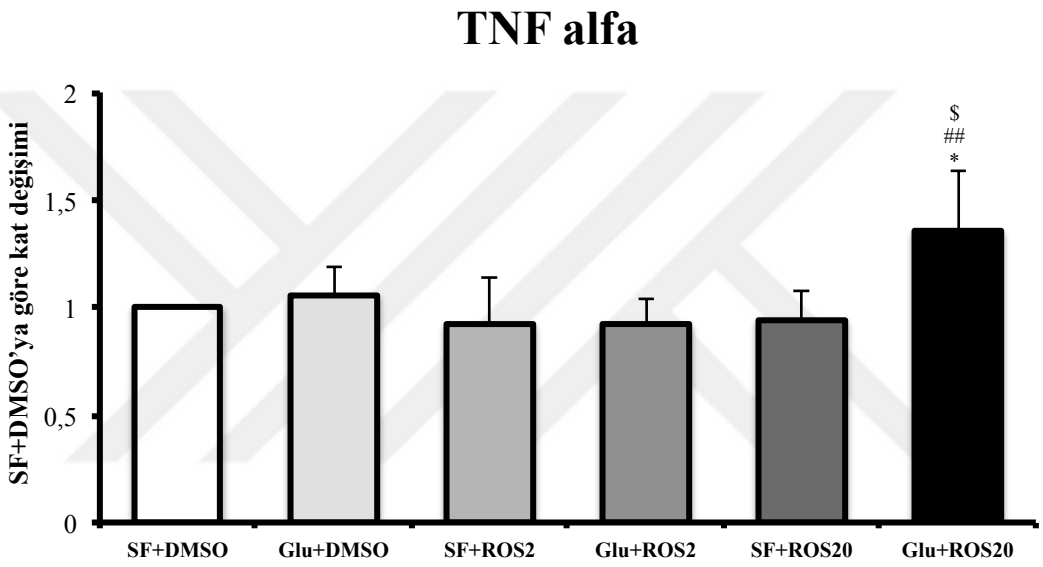
Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında IL1 beta seviyeleri; Glutatyon grubunda 0,6; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 1,27; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,83 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 0,78 ve son olarak 20 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 2,77 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.1.1: IL1 betanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2'ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20'ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

6.7.2. TNF alfa ’nın mRNA analizi

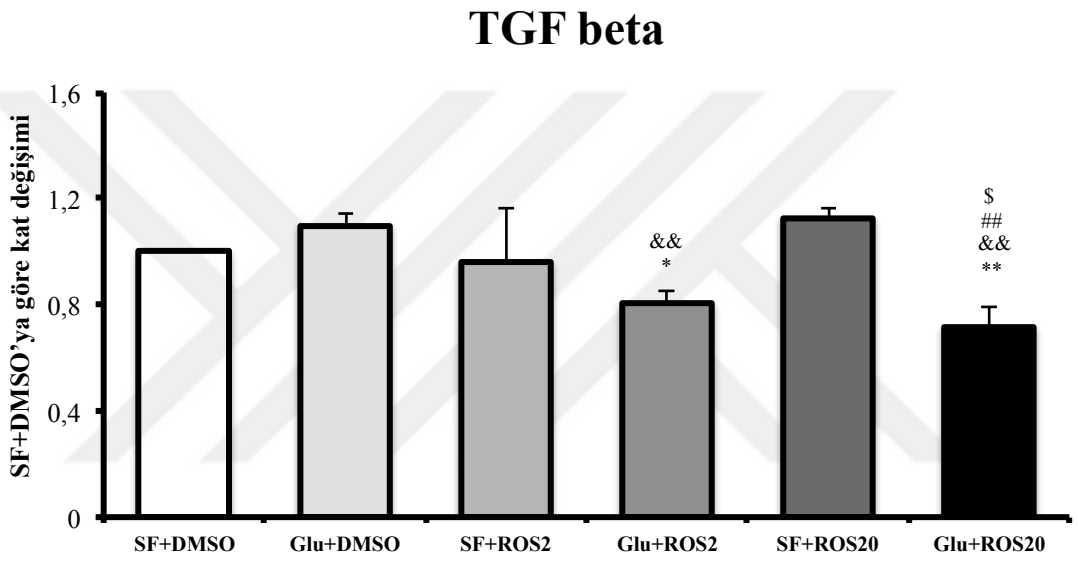
Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında TNF alpha seviyeleri; Glutatyon grubunda 1,05; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 0,92; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,92 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 0,94 ve son olarak 20 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 1,35 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.2.1: **TNF alfanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi.** Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO’ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO’ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2’ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20’ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

6.7.3. TGF beta ’nın mRNA analizi

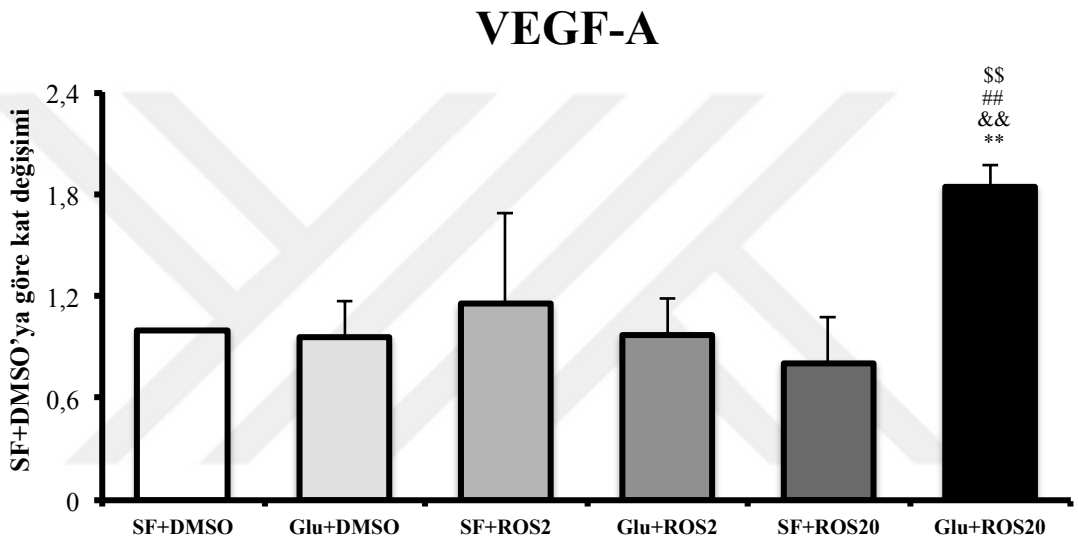
Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında TNF alpha seviyeleri; Glutatyon grubunda 1,09; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 0,96; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,80 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 1,12 ve son olarak 20 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,71 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.3.1: **TGF betanın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi.** Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO’ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO’ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2’ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## pv0.01 SF+ROS20’ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

6.7.4. VEGF-A ’nın mRNA analizi

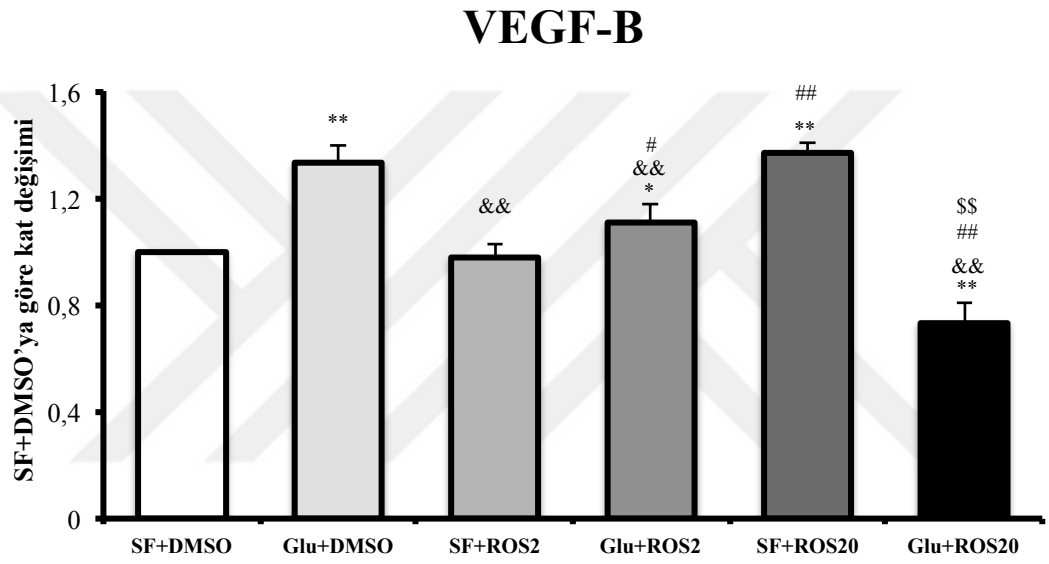
Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında TNF alpha seviyeleri; Glutatyon grubunda 0,95; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 1,15; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,97 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 0,80 ve son olarak 20mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 1,84 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.4.1: **VEGF-A’nın iskemik dokudaki gen anlatımının analizi.** Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO’ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO’ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2’ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20’ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

6.7.5. VEGF-B 'nin mRNA analizi

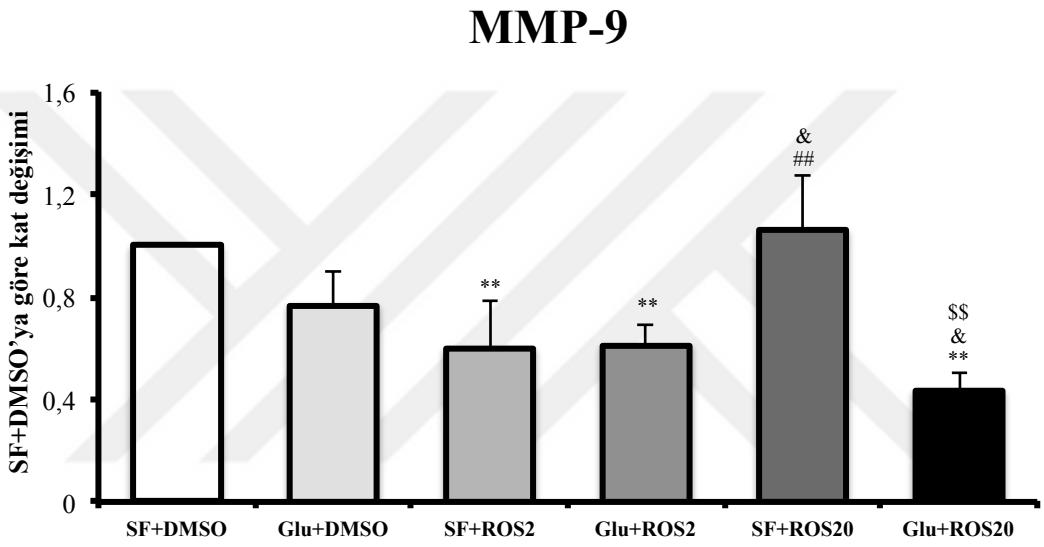
Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında TNF alpha seviyeleri; Glutatyon grubunda 1,33; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 0,97; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 1,10 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 1,36 ve son olarak 20mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,73 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.5.1: **VEGF-B'nin iskemik dokudaki gen anlatımının analizi.** Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2'ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20'ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

6.7.6. MMP 9'un mRNA analizi

Elde edilen sonuçlar SF+DMSO grubu ile karşılaştırılarak relatif gen anlatımındaki değişiklikler belirlenmiştir. SF+DMSO grubuyla kıyaslandığında TNF alpha seviyeleri; Glutatyon grubunda 0,76; Rosuvastatin 2 mg/kg grubunda 0,59; 2 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,60 Rozuvastatin 20 mg/kg grubunda 1,06 ve son olarak 20 mg/kg rozuvastatin + Glutatyon grubunda 0,43 kat artış göstermiştir.



Şekil 6.7.6.1: MMP 9'un iskemik dokudaki gen anlatımının analizi. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. SF+DMSO'ya göre anlamlılık * p≤0.05 ** p≤0.01, Glu+DMSO'ya göre anlamlılık & p≤0.05 SF+ROS2'ye göre anlamlılık # p≤0.05 ve ## p≤0.01 SF+ROS20'ye göre anlamlılık $ p≤0.05.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Literatürde Oatp1a5'e ait çalışmaların çoğu ince bağırsaktaki fonksiyonları üzerinedir (8) (85). Nöral dokuda anlatımına ilişkin çalışmalar bulunsa da özellikle merkezi sinir sistemi hasarlarını konu alan çalışma bulunmamaktadır (64, Ohtsuki, 2004 #1505, 71, 73). Daha çok Oatp1a4 üzerine yapılmış, merkezi sinir sistemini konu alan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (86), (64), (87) Mevcut tek çalışmada kullanılmış model ise serebral hipoksi gibi daha geniş çerçevede değerlendirmelerin yapılabildiği modeldir (10). Bu tez çalışmasında Oatp1a5'in merkezi sinirsistemi hasarına en uygun görülen model olan beyin felci sonrası karakterizasyonu, nörokoruyucu özelliği daha önce ispatlanmış bir subtratı olan rozuvastatin üzerinden yapılmıştır. Kandan beyin parankimine taşıma gerçkleştirdiği bilinen Oatp1a5'in beyin felci farmakoterapisinde etkin bir hedef molekül olabileceği hipotezi, taşıyıcının aktivitesinin glutatyon ile baskılandığı durumlarda hasarın ve aktive olan moleküler sinyal yolakların üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmanın kritik noktalarından biri, Oatp1a5 için kullanılan glutatyonun spesifikliğinin kanıtlanmasıdır. Bu nedenle ilaç ölçümleri çalışmalarında beyin felcinden bağımsız olarak glutatyonun rozuvastatinin nöral dokuya ve özellikle striatuma taşımasını engelleyici yönde etki gösterip göstermediğinin kanıtlanması amaçlanmıştır. Rosuvastatin ve glutatyonun enjeksiyonları OSAO operasyonlarında olduğu gibi 6 farklı grupta ve yine operasyonlarda verildiği şekilde i.v. ve i.p. yapılmıştır. Yarı ömrü 7 saat olarak verilen rozuvastatin için, hayvanların sakrifiye edilecekleri zaman dilimi referans çalışmada olduğu gibi 4 saat ve etkinliği görebilecek bir zaman dilimi daha olması açısından 3 saat olarak belirlenmiştir. n=2 ve her bir örnekten 3 er okuma ile yapılan bu ön çalışmada 3 saatin etkinliği belirlenmiş ne n=4 ile deney setleri çalışılmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki; rozuvastatin beyin parankiminde enjeksiyon dozuna bağlı olarak bir birikim göstermektedir. Ayrıca bu birikim glutatyon tarafından tersine çevirmekte ve parankimine geçiş engellenmektedir.

Literatürde Oatp1a5'in mRNA seviyesi, kapiler zenginleştirme yöntemi ile beyin mikro damar parçalarından elde edilen örneklerde tespit edilebilmiştir. Fakat Western blot analizlerinde beyin dokusunda anlatımının gösterilebildiği pek az çalışma bulunmaktadır (88, 72). Benzer problem bu tez çalışmasında da yaşanmış, ilk aşamada protein bandının görüntülenmesi mümkün olmamıştır. Bu problem yöntem açısından teknik bir hata olduğunu düşündürmüş ve yöntemin her bir basamağında optimizasyon yoluna gidilmiştir. Tekrarlanan çalışmalar sonunda çok silik bir bant görüntüsünün elde edilmesi en son analiz edilen mikro damar parçacıkları örnek tipinde Oatp1a5'in anlatımının düşük seviyelerde gerçekleştiğini düşündürmüştür. Standart yükleme miktarı olan 20 μg protein yerine yüklenebilecek maksimum miktar olan 200 μg protein ile blot analizi yapıldığında bantların elde edilmesi hipotezi destekler nitelikte yorumlanmıştır. Ayrıca, mRNA anlatımını gösterip protein görüntüsünün elde edilemediği çalışmada da 50 μg protein ile analiz yapıldığı da göz önünde bulundurulduğunda hipotezin daha da güçlendiği görülmüştür.

Mikrodamar parçalarında bulunma oranlarının yanı sıra, elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, Oatp1a5'in NVÜ'deki anlatımı beyin felcinden sonra özellikle 72. saatte zirve noktasına ulaşmaktadır. Hayvanların herhangi bir tedaviye maruz kalmadıkları tekrar göz önünde bulundurulduğunda, taşyıcı proteinin anlatımındaki artışın organizmanın beyin felcinden kaynaklı oluşan patofizyolojik ortama verdiği endojen bir cevap olduğu kesin olarak söylenebilir. Bu cevabın olumlu veya olumsuz olduğu şeklinde bir açıklama yapmak için, Oatp1a5'in baskılandığı ve baskılanmadığı durumlarda hasar analizinin yapılması gerekmiştir.

Oatp1a5'in beyin kapilerlerinde anlatımı nükleotid düzeyinde mRNA analizleri ile kesinleştirilmiş olsa da hücresel lokalizasyonu konusunda literatürde kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Araştırıcılardan bir kısmı immün florasan boyamalarda kapiler lokalizasyonunu gösterebildiğini, bir kısmı da talamus ve hipotalamustaki nöronlarda anlatımlarının gerçekleştiğini belirtmektedir. Piyasada Oatp1a5'in fareye özgü antikorunu bulmanın güçlüğü ve bahsi geçen çalışmalarda antikorun araştırıcılar

tarafından belirli amino asit dizilerine özgü üretilmiş olması bu konudaki bilgi eksikliğinin tam olarak tartışılmasına engel olmaktadır.

İmmünflorasan boyamalar da Oatp1a5in hücresel konumunun endotel hücrelere kıyasla kortikal nöronlarda olduğunu göstermektedir. İlk aşamada gerçekleştirilen doku boyamalarına göre; astrosit işaretleyicisi GFAP veya mikroglial hücre işaretleyicisi Iba-1 ile eş konumlanma göstermediği kesin olan Oatp1a5 taşıycı proteini, endotel hücre işaretleyicisi CD31 ile bir alanda 30 kadar hücreden yalnızca bir tanesinde eş lokasyon göstermektedir. Bunun yanı sıra, nöronal hücre işaretleyici NeuN ile ikli boyandığında ise hücre membranına özgü bir lokasyon göstermektedir. Triton-x, lipid yapılarını çözücü nitelikte bir deterjandır ve immünflorasan boyamalarda antikorların özellikle sitoplazmik antijen hedeflerine ulaşmalarını sağlamak için kullanılmaktadır. Mevcut çalışmada Oatp1a5'in ikili boyamalarının triton-x varlığında yapılamaması elde edilen görüntülerde nöronal hücre membranına ait konuma dair hipotezleri güçlendirmektedir.

Doku boyamalarında ortamın hücre kültürlerine göre karmaşık olması boyamaları zaman zaman güçleştirebilmektedir. Bu nedenle Oatp1a5'e ait elde edilen ve çok net olmayan görüntülerden emin olmak amacı ile primer kortikal nöron ve primer kortikal glia kültürlerinde de nöron, astrosit ve mikroglia işaretleyicileri ile boyamalar gerçekleştirilmiştir. Dokuda elde edilen sonuç daha net bir şekilde kendini göstermektedir ki, Oatp1a5 taşıyıcı proteinin anlatımı merkezi sinir sistemi nöronlarında yoğun olarak gerçekleşmektedir. Bu hipotez hem nöronal nukleus işaretleyici NeuN, hem de dokuda boyaması mümkün olmayan nöronal dendrit işaretleyici MAP2 ile Oatp1a5 in membran lokalizasyonu göstermesi ile kanıtlanmıştır.

Rozuvastatin bir HMG KoA redüktaz olmasının yanı sıra anti enflamatuvar ve nörokoruyucu özellikleri kanıtlanmış sentetik bir ilaçtır. Diğer statinler ile ortak yolaklar üzerinden etki göstermesine rağmen enflamasyonu farklı yolaklardan baskılayabilmesi ve nöroplastiteye katkıda bulıunması sebebi ile beyin felci tedavisinde diğer statinlerden daha etkin olduğu bilinmektedir (14, 41-43). Bu nedenle çalışmanın ikinci kısmında Oatp1a5'in beyin felci üzerine olan etkisi belirlenirken, etkinliği daha önce kanıtlanmış

olan rozuvastatin seçilmiştir. B grubu Seri 1 operasyonlarını geçiren hayvanlardan alınan kesitler nöronal sağ kalım ve DNA hasar kırıkları analizine tabi tutulmuştur. Sonuçlar hem 2mg/kg hem de 20mg/kg rozuvastatinin nöronal sağ kalımı kontrol grubuna göre arttırmaya yeterli olduğunu göstermektedir. Literatür ile uyumlu olan bu verinin ayırt edici özelliği, glutatyon ile birleştirildiğinde özellikle 2mg/kg rozuvastatin grubundaki nöronal hayatta kalımın kontrol grubundaki seviyeye yeniden düşmesidir. Benzer şekilde iskemik striatumda TUNEL boyaması ile tespit edilen apoptotik hücrelerin sayısı 2mg/kg rozuvastatin ve 20 mg/kg rozuvastatin uygulandığında kontrol gurbuna göre azalma gösterirken glutatyon uygulaması bu duruma tersi yönde etki göstermiştir. Verilerde dikkat edilmesi gereken, 20mg/kg rozuvastatin gruplarında glutatyonun etkinliği 2mg/kg rozuvastatindeki kadar açık bir farkla görülemiyor olmasıdır. Bu durumun sebebinin glutatyonun rozuvastatin ile doza bağlı bir etki göstermesi olarak düşünmekle beraber net bir sonuca bu aşamada varılamamıştır.

Western blot yöntemi ile protein sevyesindeki değişikliklerin değerlendirildiği kısımda ise; rozuvastatin uygulaması literatürdeki çalışmalarla benzer profilde bir etki gösteip p-p38 seviyesinde bir değişikliğe neden olmazken, 2mg/kg rosuvastatin + glutatyon grubunda p-p38 seviyesinde bir düşüş gözlenmiştir. Hücre döngüsünde mitotik faza geçişte önemi olan p21 proteinin fosforlanma ve dolayısı ile aktive olma seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülemediğinden mitotik aktiviteye bağlı bir değişikliğin gerçekleşmesinden söz edilememiştir. Son olarak bir stres kinaz olan ve aksonal dejenerasyonda rolü olduğu bilinen p-JNK seviyesinin rozuvastatin uygulaması ile düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Fakat bu düşüşe glutatyon uygulamasının bir etkisi görülmememiştir.

Apoptotik sinyal yolaklarına ilişkin proteinler incelendiğinde Bax proteini açısından açıkça görülmektedir ki, glutatyon uygulaması pro-apoptotik Bax proteinin anlatımını arttırmaktadır. Benzer şekilde glutatyon gruplarında anti apoptotik Bcl-xL protein seviyesinde düşüş gözlenmektedir. Bu durum nöronal sağ kalım ve DNA kırıkları analizi sonuçları ile de paralellik göstermektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi hücrede apoptozun

gerçekleşmesi hücre içinden yönetilen süreçler ve hücre dışı ölüm sinyalleri ile yönetilen süreçler olarak iki ayrı kolda ilerlemektedir. Aktif kaspaz-9 proteini bu süreçlerin hücre içi kısmında yer alır ve aktive olurken kazpa 8 proteini hücre dışından gelen sinyaller ile aktive olmaktadır. Her iki aktif kaspaz son aşamada kaspaz 3 proteininin aktivasyonuna neden olarak apoptozun gerçeleşmesini sağlamaktadır (22, 24, 25). Çalışmada yer alan gruplardaki aktif kazpazların protein seviyeleri incelendiğinde görülmektedir ki hem 2 mg /kg hem de 20 mg/kg rozuvastatin uygulaması kazpaz 3 protein seviyesinde düşüşe neden olmuştur. Kaspaz-8 proteininin anlatımı gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bunun yanı sıra kazpaz-9 seviyesi rozuvastatin 2 mg/kg grubunda düşüşmüş olsa da rozuvastatin 20 mg/kg grubunda daha sert bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlara göre rozuvastatinin hücre içi sinyaller ile yönetilen apoptotik süreçlere müdahale etmek sureti ile hücresel hayatta kalımı arttırdığını söylemek mümkündür.

mRNA analizi çalışmalarında hedef olarak belirlenen genler esas olarak üç gruba ayrılmaktadır; enflamatuvar cevabın oluşmasında kilit rol oynayan transkripsiyon faktörlerine ait genler (IL 1β, TNF α) anti enflamatuvar cevabın oluşmasında kilit rol oynayan transkripsiyon faktörlerine ait genler (TGF β) ve enflamatuvar cevabın profiline bağlı olarak gelişen damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-A, VEGF-B ve MMP9) (30, 31). İlgili genlere mRNA seviyesinde bakılmasındaki amaç, bahsedilen süreçleri içeren sinyal yolaklarının en başında bulunmaları ve bu sinyal yolaklarını yönetebilmek için gen anlatımlarındaki değişikliklerin birincil öneme sahip olmaları sebebi iledir.

Bu açıdan incelendiğinde elde edilen verileri şu şekilde yorumlamak mümkündür; kontrol grubu ile kıyaslandığında, pro enflamatuvar cevabın istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği grup Ros 20 mg/kg + glutatyon grubudur. Glutatyon diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmaz iken, açık bir şekilde IL 1β, TNF α seviyelerinin Ros 20 mg/kg + SF ve diğer gruplara göre artmasına sebep

olmaktadır. Benzer şekilde anti enflamatuvar cevabın Ros 20 mg/kg + glutatyon grubunda en düşük seviyede aktive olduğu TGF β seviyesinin takibinden anlaşılmaktadır. Üçüncü parametre olan damarlaşmaya bakıldığında, pro ve anti enflamatuvar cevabın kümülatif etkisi kenisini Ros 20 mg/kg + glutatyon grubunda VEGF-B seviyesi üzerinde göstermiş ve diğer gruplara kıyasla en düşük seviyede seyretmiştir.

Elde edilen sonuçlar bir araya getirilerek değerlendirildiğinde denilebilir ki; Oatp1a5 taşıyıcısı, farelerde iskemi sonrasında anlatımı artış gösteren bir SLC ailesi üyesidir. Substrat profili endojen molekülleri içermekle beraber, piyasada mevcut olan ve MSS'de iskemi sonrası gelişen hasarın engellenmesindeki olumlu etkileri önceden kanıtlanmış olan rozuvastatini de içermektedir.

Bu çalışmada özgün olarak ortaya konduğu üzere Oatp1a5 taşıyıcıları kan beyin bariyerini oluşturan nörovsküler ünitede anlatımı gerçekleşmek ile beraber daha çok oranda kortikal nöronlarda ifade edilmektedir. Bu durum Western blot ve immun florasan boyama çalışmaları ile ortaya konmuştur. Ayrıca rozuvastatinin kandan beyin parankimi ve nöronlara taşınmalarının esas olarak Oap1a5 üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Oatp1a5 baskılyacısı olarak tanımlanan glutatyonun uygulandığı durumlarda gerçekleştirilen ilaç ölçümlerinde rozuvastatinin serumda biriktiği ve beyin parankiminde çok düşük miktarlarda tespit edilebildiği gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler pro- apoptotik ve anti- apoptotik proteinlerin seviyelerindeki, enflamatuvar ve damarlaşma ile ilgli süreçlerde rol alan transkripsyon faktörlerinin mRNA analizi sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde 2 mg/kg ve 20 mg /kg rozuvastatinin nöronal hayatta kalımı arttırdığını ve rozuvastatin geçişinin glutatyon ile baskılandığı durumlarda bu hayatta kalımın baskılandığını söylemek mümkündür.

Sonuç olarak; Oatp1a5 taşıyıcısı hem KBB'de hem de nöronlarda bulunup, rozuvastatin gibi sentetik nörokoruyucu maddelerin iskemik beyin hasarı sonrası beyin parankimine geçişinden sorumludurlar. Bu sebeple, Oatp1a5 proteini, substratları olarak sentezlenecek daha etkin ilaç moleküllerinin geliştirilmesi sureti ile beyin

farmakoterapisinde hedeflenmesi önem arzeden potansiyel bir taşıyıcı olarak tanımlanmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Wu, W., A.V. Dnyanmote, and S.K. Nigam, Remote communication through solute carriers and ATP binding cassette drug transporter pathways: an update on the remote sensing and signaling hypothesis Mol Pharmacol, 2011. **79**(5): p. 795-805.

2. Meier, P.J. and B. Stieger, Bile salt transporters Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 635-61.

3. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 653-65.

4. Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch, OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies Br J Pharmacol, 2012. **165**(5): p. 1260-87.

5. Ronaldson, P.T. and T.P. Davis, Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia Pharmacol Rev, 2013. **65**(1): p. 291-314.

6. Shirasaka, Y., et al., Concentration-dependent effect of naringin on intestinal absorption of beta(1)-adrenoceptor antagonist talinolol mediated by p-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide (Oatp) Pharm Res, 2009. **26**(3): p. 560-7.

7. Uno, S., et al., Changes in mRNA expression of ABC and SLC transporters in liver and intestines of the adjuvant-induced arthritis rat Biopharm Drug Dispos, 2009. **30**(1): p. 49-54.

8. Arakawa, H., et al., Active intestinal absorption of fluoroquinolone antibacterial agent ciprofloxacin by organic anion transporting polypeptide, Oatp1a5 Biopharm Drug Dispos, 2012. **33**(6): p. 332-41.

9. Suzuki, M., et al., Characterization of gastrointestinal absorption of digoxin involving influx and efflux transporter in rats: application of mdr1a knockout (-/-) rats into absorption study of multiple transporter substrate Xenobiotica, 2014. **44**(11): p. 1039-45.

10. Thompson, B.J., et al., Hypoxia/reoxygenation stress signals an increase in organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) at the blood-brain barrier: relevance to CNS drug delivery J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(4): p. 699-707.

11. Kassan, M., M.J. Montero, and M.A. Sevilla, In vitro antioxidant activity of pravastatin provides vascular protection Eur J Pharmacol, 2010. **630**(1-3): p. 107-11.

12. Barone, E., et al., Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action Pharmacol Res, 2011. **63**(3): p. 172-80.

13. Butterfield, D.A., et al., Atorvastatin treatment in a dog preclinical model of Alzheimer's disease leads to up-regulation of haem oxygenase-1 and is associated with reduced oxidative stress in brain Int J Neuropsychopharmacol, 2012. **15**(7): p. 981-7.

14. Seker, F.B., et al., HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via mechanisms involving eNOS Neuroscience, 2015. **284**: p. 349-59.

15. Dobson, P.D. and D.B. Kell, Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(3): p. 205-20.

16. Hagenbuch, B. and C. Gui, Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 778-801.

17. Hu, S., et al., Interaction of imatinib with human organic ion carriers Clin Cancer Res, 2008. **14**(10): p. 3141-8.

18. Bakhai, A., The burden of coronary, cerebrovascular and peripheral arterial disease Pharmacoeconomics, 2004. **22 Suppl 4**: p. 11-8.

19. Heuschmann, P.U., et al., Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group Stroke, 2003. **34**(5): p. 1106-13.

20. Deb, P., S. Sharma, and K.M. Hassan, Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis Pathophysiology, 2010. **17**(3): p. 197-218.

21. Karaszewski, B., et al., Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke Brain, 2009. **132**(Pt 4): p. 955-64.

22. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view Trends Neurosci, 1999. **22**(9): p. 391-7.

23. Hossmann, K.A., Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia Ann Neurol, 1994. **36**(4): p. 557-65.

24. Joza, N., et al., Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death Nature, 2001. **410**(6828): p. 549-54.

25. Ekshyyan, O. and T.Y. Aw, Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders Curr Neurovasc Res, 2004. **1**(4): p. 355-71.

26. Gupta, S., et al., Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway Science, 1995. **267**(5196): p. 389-93.

27. Barone, F.C. and A.A. Parsons, Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(10): p. 2281-306.

28. Green, S.L., K.S. Kulp, and R. Vulliet, Cyclin-dependent protein kinase 5 activity increases in rat brain following ischemia Neurochem Int, 1997. **31**(4): p. 617-23.

29. Cebe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjallman, and K. Ballmer-Hofer, The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 601-15.

30. Tanasescu, R., et al., An immunological approach to cerebral ischemia (I). Immune cells and adhesion molecules Rom J Intern Med, 2008. **46**(1): p. 3-8.

31. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies CNS Neurol Disord Drug Targets, 2008. **7**(3): p. 243-53.

32. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, Altered lipid metabolism in brain injury and disorders Subcell Biochem, 2008. **49**: p. 241-68.

33. Pandian, J.D., Re-canalization in acute ischemic stroke: the strategies Neurol India, 2009. **57**(1): p. 20-7.

34. Crouse, J.R., 3rd, R.P. Byington, and C.D. Furberg, HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 11-24.

35. Di Napoli, M., Early inflammatory response in ischemic stroke Thromb Res, 2001. **103**(3): p. 261-4.

36. Cimino, M., et al., Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia Neurotoxicology, 2005. **26**(5): p. 929-33.

37. Sironi, D., et al., Decrease of ultrasound estimated bladder weight during tamsulosin treatment in patients with benign prostatic enlargement Arch Ital Urol Androl, 2002. **74**(2): p. 90-4.

38. Wang, L., et al., Atorvastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors (RAGE and TLR4), NF-kappaB expression Neurosci Lett, 2010. **471**(3): p. 152-6.

39. Laufs, U., et al., Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice Stroke, 2000. **31**(10): p. 2442-9.

40. Cui, L., et al., Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability Brain Res, 2010. **1325**: p. 164-73.

41. Laufs, U., et al., Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice Brain Res, 2002. **942**(1-2): p. 23-30.

42. Gedikli, O. and M. Baykan, [Statins in stroke prevention] Anadolu Kardiyol Derg, 2008. **8**(3): p. 217-22.

43. Kilic, U., et al., Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2 Neuroscience, 2005. **134**(3): p. 901-6.

44. Libby, P., Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes Circulation, 2001. **104**(3): p. 365-72.

45. Abe, K., [Neuroprotective therapy for ischemic stroke with free radical scavenger and gene-stem cell therapy] Rinsho Shinkeigaku, 2008. **48**(11): p. 896-8.

46. Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey, Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia Stroke, 2009. **40**(5): p. e331-9.

47. Yuan, J., Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 469-77.

48. Murata, Y., et al., Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke Stroke, 2008. **39**(12): p. 3372-7.

49. Beker, M.C., et al., Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30604-14.

50. Reitmeir, R., et al., Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity Brain, 2011. **134**(Pt 1): p. 84-99.

51. Lebesgue, D., et al., Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection Steroids, 2009. **74**(7): p. 555-61.

52. del Zoppo, G., et al., Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia Brain Pathol, 2000. **10**(1): p. 95-112.

53. Bath, P.M., et al., Statistical analysis plan for the 'Efficacy of Nitric Oxide in Stroke' (ENOS) trial Int J Stroke, 2014. **9**(3): p. 372-4.

54. O'Collins, V.E., et al., 1,026 experimental treatments in acute stroke Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 467-77.

55. Loscher, W. and H. Potschka, Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(8): p. 591-602.

56. Begley, D.J., Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities Pharmacol Ther, 2004. **104**(1): p. 29-45.

57. Hermann, D.M., et al., Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain Ann Neurol, 2006. **60**(5): p. 489-98.

58. Obermeier, B., A. Verma, and R.M. Ransohoff, The blood-brain barrier Handb Clin Neurol, 2016. **133**: p. 39-59.

59. Dejana, E. and C. Giampietro, Vascular endothelial-cadherin and vascular stability Curr Opin Hematol, 2012. **19**(3): p. 218-23.

60. Huber, J.D., R.D. Egleton, and T.P. Davis, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier Trends Neurosci, 2001. **24**(12): p. 719-25.

61. Li, F., et al., Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch Dev Cell, 2011. **20**(3): p. 291-302.

62. Spudich, A., et al., Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia Nat Neurosci, 2006. **9**(4): p. 487-8.

63. Kilic, E., et al., ABCC1: a gateway for pharmacological compounds to the ischaemic brain Brain, 2008. **131**(Pt 10): p. 2679-89.

64. Abe, T., et al., Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2 J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22395-401.

65. Noe, B., et al., Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10346-50.

66. Reichel, C., et al., Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 688-95.

67. Gao, B., et al., Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(1): p. 73-9.

68. van Montfoort, J.E., et al., Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(1): p. 147-52.

69. Li, L., P.J. Meier, and N. Ballatori, Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione Mol Pharmacol, 2000. **58**(2): p. 335-40.

70. Li, N., et al., Tissue expression, ontogeny, and inducibility of rat organic anion transporting polypeptide 4 J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(2): p. 551-60.

71. Kusuhara, H., et al., Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus Pharm Res, 2003. **20**(5): p. 720-7.

72. Ohtsuki, S., et al., Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cells J Neurochem, 2004. **90**(3): p. 743-9.

73. Cattori, V., et al., Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3 Pflugers Arch, 2001. **443**(2): p. 188-95.

74. Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic, Central nervous system pericytes in health and disease Nat Neurosci, 2011. **14**(11): p. 1398-405.

75. Peppiatt, C.M., et al., Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes Nature, 2006. **443**(7112): p. 700-4.

76. Hall, C.N., et al., Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease Nature, 2014. **508**(7494): p. 55-60.

77. Gee, J.R. and J.N. Keller, Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(6): p. 1145-50.

78. Mathiisen, T.M., et al., The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction Glia, 2010. **58**(9): p. 1094-103.

79. Hayashi, A., et al., Induction of autoimmune-like hepatic and ductal lesions by administration of lipopolysaccharide in mice undergoing graft-versus-host reaction across MHC class I difference Immunol Lett, 1997. **59**(3): p. 159-70.

80. Colgan, O.C., et al., Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function Brain Res, 2008. **1193**: p. 84-92.

81. Hallmann, R., et al., Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 979-1000.

82. Sixt, M., et al., Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 933-46.

83. Loscher, W., A. Rohlfs, and C. Rundfeldt, Reduction in firing rate of substantia nigra pars reticulata neurons by valproate: influence of different types of anesthesia in rats Brain Res, 1995. **702**(1-2): p. 133-44.

84. Prinz, V., et al., Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study Stroke, 2008. **39**(2): p. 433-8.

85. Tani, T., et al., Involvement of organic anion transporting polypeptide 1a5 (Oatp1a5) in the intestinal absorption of endothelin receptor antagonist in rats Pharm Res, 2008. **25**(5): p. 1085-91.

86. Ohtsuki, S., et al., Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier J Neurochem, 2007. **103**(4): p. 1430-8.

87. Gao, B., et al., Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain J Histochem Cytochem, 1999. **47**(10): p. 1255-64.

88. Walters, H.C., et al., Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(6): p. G1188-200.

9. ETİK KURUL

T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
24/02/2015	25		Doç. Dr. Burak YULUĞ

"Solüt taşıyıcılarının beyin hasarı farmakoterapisideki rolü" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "**oybirliği**" ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	**Soyadı**	Yalçın
Doğum Yeri	İzmir	**Doğum Tarihi**	15.06.1988
E-mail	eyalcin@medipol.edu.tr	**Uyruğu**	T. C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Yüksek Lisans	Fatih Üniversitesi	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2009
Lise	Özel Gaziosmanpaşa Şefkat Listesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl – Yıl)**
1. Öğretim Görevlisi		İstanbul Medipol Üniversitesi	2013 -
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama**	**Konuşma**	**Yazma**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi
Japonca	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
			104					

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	77.4	79.2	70.6
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanım becerisi**
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi

Adobe Photoshop	Temel

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

Uluslararası Yayınlar

1. Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, **Yalcin E**, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Yulug B, Yılmaz B, Kerman BE, Kilic E. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. Redox Biol. 2017 Aug;12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006. Epub 2017 Apr 5.
2. Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, **Yalcin E,** Beker M, Kelestemur T, Sertel E, Ozturk G, Kilic U, Sahin F, Kilic E. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. Exp Neurol. 2017 Jun 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.
3. .Beker MC, Caglayan B, **Yalcin E,** Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, Kelestemur T, Sertel E, Sahin Z, Kutlu S, Kilic U, Baykal AT, Kilic E. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. Mol Neurobiol. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
4. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, **Yalcin E,** Gundogdu RZ, Kilic E. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. Neurosci Lett. 2016 Jan 26;612:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.043.
5. Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, **Yalcin E,** Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):30604-14. doi: 10.18632/oncotarget.5773.

Uluslararası Bildiriler

1. Poster- Beker MC, Caglayan AB, **Yalcin E,** Kilic U, Baykal AT, Gurel B, Kilic E, "Proteomic Approach To Circadian Rhythm After Brain Injury", 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, **Yalcin E,** Kilic U, Sarma M, Kilic E, "The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling", 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
3. Poster- Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, **Yalcin E,** Altunay S, Kelestemur T, Gunal MY, Hanoglu L, Yulug B, Kilic E, "Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neuronal survival in the acute phase and stroke-recovery in the sub-acute phase of focal cerebral ischemia" 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
4. Poster- **Yalcin E,** Caglayan AB, Beker MC, Gurel B, Kelestemur T, Caglayan B, Dalay A, Dilden A, Altunay S, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, "Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain" 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
5. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Altunay S, Caglayan B, **Yalcin E,** Gundogdu RZ, Kilic E, "Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice" Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
6. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, **Yalcin E**, Ozturk G, Kilic E "Inhibition but not activation of P2X7 receptors improves brain epileptiform activity in mice: Role of iNOS activation" Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
7. Poster- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, **Yalcin E,** Ozturk G, Kilic E, "Roles of oxygen treatment in the development of ischemic brain injury, signal transduction and brain microcirculation after focal cerebral ischemia"

Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.

Ulusal Bildiler ve Sözlü Sunumlar

1. Sözlü Sunum- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, **Yalcin E,** Dalay A, Altunay A, Sertel E, Kilic E, "Effects of Circadian Rhythm on Brain Injury and Related Molecular Mechanisms" 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 20/32, Düzce, 2016.
2. Sözlü Sunum- Kelestemur T, Beker MC, Caglayan AB, **Yalcin E,** Altunay S, Dalay A, Sertel E, Dilden A, Caglayan B, Kilic E, "Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia" Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/ Turkey, 2016.
3. Poster- **Yalcin E,** Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kilic E, "The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy" Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress , PC108, Düzce/Turkey, 2016.
4. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, **Yalcin E,** Kilic U, Saarma M, Kilic E, "Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia" Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016
5. Sözlü Sunum- Caglayan AB, **Yalcin E,** Beker MC, Caglayan B, Kelestemur T, Ozturk G, Kilic E "In vivo ve in vitro P2X7 receptörü aracılı nöronal sağkalım mekanizması" 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
6. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, **Yalcin E,** Ozturk G, Kilic E "P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü" 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.

7. Poster- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, **Yalcin E,** Caglayan B, Kilic E "Melatonin ve normobarik oksijen tedavisinin reperfüzyon hasarına etkileri" 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
8. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, **Yalcin E,** Ozturk G, Kilic E "P2X7 reseptör baskılanması ve aktivasyonunun beyin epileptiform aktivitesi, mikrodolaşımı ve hücre içi sinyal iletim molekülleri üzerine olan etkileri" 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
9. Poster- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, **Yalcin E,** Ozturk G, Kilic E "Normobarik oksijen tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar, sinyal mekanizmaları ve beyin kan dolaşımına olan etkileri" 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014