

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİRKADİYEN RİTMİN BEYİN FELCİ SONRASI
GELİŞEN HASAR ÜZERİNE ETKİSİ**

MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. ZAFER ŞAHİN

KONYA 2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİRKADİYEN RİTMİN BEYİN FELCİ SONRASI
GELİŞEN HASAR ÜZERİNE ETKİSİ**

MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. ZAFER ŞAHİN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 161330001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER'in "Sirkadiyen ritmin beyin felci sonrası gelişen hasar üzerine etkisi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 15.01.2018

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zafer Şahin

Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Selim Kutlu

Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 19/01/2018 tarih ve 02 / ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "Role of circadian rhythm on focal cerebral ischemia" by Mustafa Çağlar Beker that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of Physiology, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

Konya, Turkey / 15.01.2018

Principal Advisor

Assist. Prof. Dr. Zafer Şahin

Necmettin Erbakan University

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Selim Kutlu

Necmettin Erbakan University

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Istanbul Medipol University

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOGLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15.01.2018

Mustafa Çağlar Beker



TURNİTİN RAPORU

SİRKADYEN RİTMİN BEYİN FELCİ SONRASI GELİŞEN HASAR
ÜZERİNE ETKİSİ

MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

ÖRJNALLIK RAPORU

% **10**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **8**

YAYINLAR

% **3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Mustafa Caglar Beker, Berrak Caglayan, Esra Yalcin, Ahmet Burak Caglayan, Seyma Turkseven, Busra Gurel, Taha Kelestemur, Elif Sertel, Zafer Sahin, Selim Kutlu, Ulkan Kilic, Ahmet Tarik Baykal, Ertugrul Kilic. "Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT", Molecular Neurobiology, 2017

Yayın

% **5**

2

Submitted to Konya Necmettin Erbakan University

Öğrenci Ödevi

% **1**

3

www.tod.org.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

4

SEFİL, Fatih, KOZAN, Ramazan, BOSTANCI, M. Ömer and BAĞIRICI, Faruk. "Demirin neden olduğu purkinje hücre kaybı üzerine nitrik oksit sentaz inhibisyonunun koruyucu etkisi", Tıp

<% **1**

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zafer Şahin'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Akademik hayatım boyunca her zaman beni destekleyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç ve Prof. Dr. Selim Kutlu hocalarımın saygılarımı sunarım.

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

Her zaman yanımda olan ve en büyük destekçim olan kıymetli aileme en kalbi dileklerle teşekkür ederim.

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161330001 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak Sayfası</i>	i
<i>Tez Onay Sayfası</i>	ii
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	iv
<i>Önsöz ve Teşekkür</i>	v
<i>İçindekiler</i>	vi
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	viii
<i>Şekiller Listeri</i>	x
<i>Türkçe Özet</i>	xi
<i>Abstract</i>	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Beyin Felci</i>	2
2.1.1. <i>Beyin Felci Patofizyolojisi</i>	2
2.1.2. <i>Beyin Felci Sonrası Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizması</i>	5
2.1.3. <i>Serbest Oksijen Radikallerinin Etkisi</i>	6
2.2. <i>Sirkadiyen Ritim</i>	7
2.2.1 <i>Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizmaları</i>	7
2.2.2. <i>Sirkadiyen Ritim Proteinlerinin Görevleri ve Fonksiyonları</i>	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. <i>Deney Dizaynı ve Gruplar</i>	11
3.2. <i>Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli</i>	12
3.3. <i>Cryostat Cihazı ile Beyin Kesimi</i>	13
3.4. <i>NeuN Boyaması</i>	13
3.5. <i>DNA Fragmantasyonu</i>	14
3.6. <i>Western Blot ile Protein Analizi</i>	15
3.6.1. <i>Protein İzolasyonu</i>	15
3.6.2. <i>Protein Konsantrasyonu Ölçümü</i>	15
3.6.3. <i>Jel Elektroforezi</i>	15
3.6.4. <i>Jelden Membrana Protein Transferi</i>	16
3.6.5. <i>Antikorlar ile Protein Analizi</i>	16
3.6.6. <i>Western Blot Değerlendirmesi</i>	17
3.7. <i>Pathscan Protein Analizi</i>	17

3.8. <i>Proteomiks</i>	18
3.8.1. <i>Protein Ekstraksiyon Protokolü</i>	18
3.8.2. <i>FASP Protokolü</i>	18
3.8.3. <i>Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/ MS) Analizi</i>	19
3.8. <i>İstatistiksel Analizler</i>	19
4. BULGULAR	20
4.1. <i>Laser Doppler Kan Akımı</i>	20
4.2. <i>Nöronal Sağkalım Analizi</i>	21
4.3. <i>Apoptotik Hücre Analizi</i>	22
4.4. <i>Per1 Protein Analizi</i>	23
4.5. <i>Per2 Protein Analizi</i>	24
4.6. <i>CLOCK Protein Analizi</i>	25
4.7. <i>Bmal1 Protein Analizi</i>	26
4.8. <i>p53 Protein Analizi</i>	27
4.9. <i>Pathscan Analizi</i>	28
4.10. <i>Proteomiks</i>	32
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	40
Ek 1. <i>Özgeçmiş</i>	45
Ek 2. <i>Etik Kurul Onayı</i>	50

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

NMDA	N-metil- D-aspartat
AMPA	Aamino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit
IL-1 β	İnterleukin-1 β
NO	Nitrik oksit
Cytc	Sikokrom c
Apaf-1	Apopitotik protein aktive edici faktör-1
ADP	Adenozin difosfat
PARP	ADP-riboz polimeraz
ROS	Reaktif oksijen türleri
Per1	Period1
Per2	Period2
Per3	Period3
Cry1	Cryptochrome1
Cry2	Cryptochrome2
CLOCK	Transkripsiyon faktörleri Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
Bmal1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
Npas2	Nöronal PAS domain protein 2
CK1E	Kazein Kinaz 1E
SKN	Supra kiazmatik nükleus
OSA	Orta serebral arter
LDF	Laser Doppler akımı
PFA	Paraformaldehit
PBS	Fosfat buffer saline
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
TUNEL	Terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling
ZT	Zeitgeber zamanı
PVDF	Poli-viniliden florür
TBS	Tris-Buffer Saline
UPX	Universal Protein Ekstraksiyonu
LC	Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi

CSKP	Kalsiyum/ Kalmodulin bağımlı serin protein kinaz
GNAZ	Guanin nükleotid bağlama proteini z alt birim alfa
NEGR1	Nöronal büyüme düzenleyicisi-1
IMPCT	Baskılı ve eski protein
PDE1B	Kalsiyum/ kalimodulin bağımlı 3', 5'-siklik nükleotid fosfodiesteraz
HBA	Hemoglobin alt birim alfa
HBB1	Hemoglobin alt-birim beta-1
HBB2	Hemoglobin alt-birim beta-2
tPA	Doku plazminojen aktivatörü
HIF-1 α	Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1.1. Beyin felci sonrası gelişen iskemik kor ve penumbra bölgesi.....	3
Şekil 2.1.1.2. Beyin felci sonrası gelişen patofizyolojik süreçlerin şematik gösterimi	4
Şekil 2.1.2.1. Beyin felci sonrası apoptotik hücre ölüm mekanizması.....	6
Şekil 2.2.1.1. Per ve Cry genlerinin aktivitelerinin kontrolü.	7
Şekil 3.1.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak 30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon deney dizaynı.. ..	11
Şekil 3.2.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak 30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon deney dizaynı.	13
Şekil 4.1.1. Beyin felci sırasında ve reperfüzyon başlangıcında Laser Doppler kan akımı.....	20
Şekil 4.2.1. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi.....	21
Şekil 4.3.1. TUNEL boyaması ile iskemik striatumdan apoptotik hücre ölümü analizi	22
Şekil 4.4.1. Sirkadiyen ritim proteini Per1'in Western Blot ile analizi	23
Şekil 4.5.1. Sirkadiyen ritim proteini Per2'nin Western Blot ile analizi	24
Şekil 4.6.1. Sirkadiyen ritim proteini CLOCK seviyesinin Western Blot ile analizi.	25
Şekil 4.7.1. Sirkadiyen ritim proteini Bmal1'in Western Blot ile analizi.....	26
Şekil 4.8.1. p53 protein seviyesinin Western Blot yöntemi ile analizi.....	27
Şekil 4.9.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası ZT0 ve ZT6 grubu Akt sinyal yolağı analizinin görseli.....	28
Şekil 4.9.2. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası ZT12 ve ZT18 grubu Akt sinyal yolağı analizinin görseli.....	28
Şekil 4.9.3. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı p-Akt (Thr308), p-ERK-1/-2 (Thr202/ Tyr204), p-mTOR (Ser2481), ve p-rpS6 (Ser235/ 236) analizi.....	29
Şekil 4.9.4. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı p-Bad (Ser112), p-PRAS40 (Thr246), p-PTEN (Ser380) ve p-PDK1 (Ser241) analizi	30
Şekil 4.9.5. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı p-RSK1 (Thr421/ Ser424), p-AMPK α (Thr172), p-GSK-3 α (Ser21), ve p-GSK-3 β (Ser9) analizi	31
Şekil 4.10.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası değişen CSKP, GNAZ, NEGR1 ve IMPCT protein seviyelerinin LC-MS/ MS analizi.....	33
Şekil 4.10.2. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası değişen PDE1B, HBA, HBB1 ve HBB2 protein seviyelerinin LC-MS/ MS analizi.....	34

ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sirkadiyen Ritmin Beyin Felci Sonrası

Gelişen Hasar Üzerine Etkisi

Mustafa Çağlar Beker

Fizyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONYA-2018

Sirkadiyen ritim, günlük fizyolojik fonksiyonları ayarlamakla kalmayıp aynı zamanda patofizyolojik süreçleri de etkileyen biyolojik bir saattir. Daha önceki çalışmalara bağlı olarak serebral iskemi ve sirkadiyen ritim arasında kuvvetli bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Günümüze kadar sirkadiyen ritim ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu klinik gözlemlere dayandığından çalışmalar kısıtlı bir alanda kalmıştır. Bununla birlikte, iskemi sonrası patofizyolojik olaylara karşı sirkadiyen ritmin göstereceği hücre ve moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir.

Bu amaçla 8-12 haftalık erkek Balb/ C farelerine 6 saatlik aralıklarla (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) dört farklı zaman noktasında 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saatlik reperfüzyon gerçekleştirildi. Nöronal sağkalım ve apoptotik hücre ölümü immuno-histokimyasal metotlarla incelendi. Biyolojik saat proteinleri; Period-1, Period-2, CLOCK ve Bmal1 protein ifadeleri Western Blot ile değerlendirildi. Ek olarak, PI3K sinyal yolağı Pathscan metoduyla değerlendirildi. Sirkadiyen ritim ile ilişkili proteinler sıvı kromatografi-kütle spektrometresi yöntemleri ile analiz edildi.

Yapılan bu çalışmada zamana bağlı olarak değişen sirkadiyen ritim proteinleri beyin felci sonrası gelişen beyin hasarını doğrudan etkilediğinin kanıtlarını sunulmaktadır. Gece yarısı (ZT18; 24:00) beyin felci geçiren farelerde sabah (ZT0, 06:00) beyin felci geçirenlere göre sirkadiyen ritim proteinleri Bmal1, Per1 ve CLOCK proteinlerinin seviyeleri arttığı ve bunlarla beraber nöronal sağkalımın arttığı, apoptotik hücre sayısının ise azaldığı gösterildi. Ayrıca yapılan protein çalışmaları ile bu etkileri sağkalım kinazlarından p-AKT ve p-Erk-1/2 üzerinden yaptığı gösterildi. Bu bilgilere ek olarak yapılan geniş ölçekli proteomik analizi sonucu sabah ZT0'a kıyasla; ZT18 grubunda GNAZ, NEGR1, IMPCT ve PDE1B seviyesi artarken, CSKP, HBB1, HBB2 ve HBA düzeyleri anlamlı ölçüde düştüğü gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, gece beyin felci geçirenlerde nöronal hasarın daha az olduğu ve bunu sağkalım kinazları ve sirkadiyen ritim ile alakalı proteinlerin ifadesinin artmasıyla sağladığı gösterildi.

Anahtar kelimeler: Akt sinyal yolağı; Beyin felci; Bmal1; Proteomiks; Sirkadiyen ritim

İNGİLİZCE ÖZET

Circadian clocks are endogenous timers not only adjusting daily physiological functions but also affect pathophysiological processes. Depends on previous studies, there have been strong relation between cerebral ischemia and circadian rhythm. In addition, occurrence of stroke cases displays a time of day variation. To date, most of the circadian expression studies remained restricted with clinical observations. Nevertheless, the molecular and cellular mechanism linking circadian rhythm to the internal response mechanisms against pathophysiological events after ischemia remained largely unknown.

To this end, 8-12 weeks male Balb/c mice were exposed to min of MCAO following 72 h reperfusion at four different Zeitgeber time (ZT) points with 6-h intervals (ZT0, ZT6, ZT12, and ZT18). Disseminate neuronal injury and DNA fregmantation were examined using immunohistochemistry. Core clock proteins; Period-1, Period-2, CLOCK and Bmal1 protein expressions were evaluated by Western Blot. In addition, PI3K signaling pathway analysed via planar surface immune assay and circadian rhythm related proteins were evaluated by liquid chromatography– mass spectrometry tools.

Here, we present evidence that activational changes of proteins by circadian rhythm regulations directly influence brain injury following cerebral ischemia. Midnight (ZT18; 24:00) I/R injury in mice resulted in significantly improved neuronal survival, and decreased apoptosis compared with ischemia induced at ZT0 (06:00), which were associated with increased expressions of circadian proteins Bmal1, Per1, and Clock proteins and survival kinases p-AKT and p-Erk-1/2. Furthermore, proteomics revealed significantly reduced CSKP, HBB1, HBB2, and HBA levels, while increased GNAZ, NEGR1, IMPCT, and PDE1B at midnight as compared with ZT0. Results showed that nighttime ischemic injury results in less severe neuronal damage, with increased neuronal survival, increased levels of survival kinases and circadian clock proteins, and also alters the circadian-related proteins.

Keywords: Akt signaling; Bmal1; Cerebral ischemia; Circadian rhythm; Proteomics

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sirkadiyen ritim günlük fizyolojik fonksiyonlarımızın yanı sıra beyin felci gibi patofizyolojik süreçlerin hem tetiklenmesinde hem de gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. 1970'li yıllardan günümüze kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu sirkadiyen ritim ile beyin felcinin tetiklenmesi veya mortalite üzerine odaklanmıştır (Terayama 2013, Uddin ve ark. 2015). Sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen vücut sıcaklığı, kalp hızı, kan basıncı, kan viskozitesi ve trombosit agregasyonu beyin felcinin tetiklenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kubota ve ark. 1987). Bu bilgilere ek olarak, beyin felci günün her saatinde görülebilmektedir. Fakat vakaların büyük bir çoğunluğu sabah saatlerinde ve özellikle de uyandıktan sonraki ilk iki saatlik sürede görülmektedir (Pardiwalla ve ark. 1993, Elliott 1998). Ayrıca inme insidansında gece yarısından sabah 06:00'a kadar geçen sürede ise en düşük olduğu bilinmektedir.

İskemik inmenin insidansındaki gün içi değişebilirliğine ek olarak, inme şiddetinin ve dolayısıyla da mortalitenin de sirkadiyen bir ritim gösterdiği düşünülmektedir (Manev ve Uz 1998). Bu bilgiler dâhilinde beyin felci sonrası gelişen hasar mekanizmaları ile sirkadiyen ritmin hücrel ve moleküler sinyal yolları arasındaki bağlantı büyük bir oranda bilinmemektedir.

Yapılan bu çalışma ile sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası gelişen hasar mekanizmaları arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla farelerin sirkadiyen ritimlerine bağlı olarak dört farklı zaman aralığında (06:00, 12:00, 18:00 ve 00:00) 30 dakikalık orta serebral arter (OSA) tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından, dört farklı zaman diliminde biyolojik saatin beyin felci sonrası gelişen hasar, nöronal sağ-kalım, apoptotik hücre ölümü ve hücre içi sinyal moleküllerinin aktivasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Felci

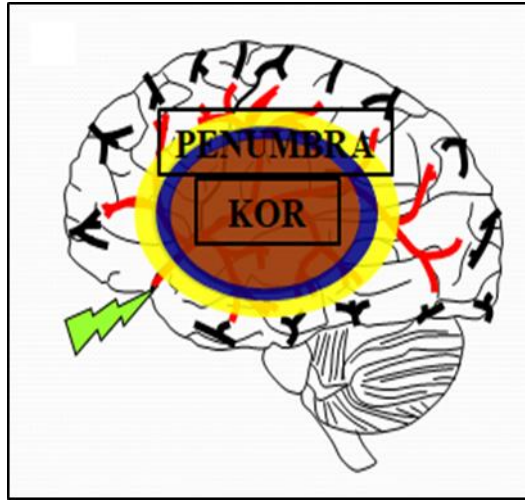
Beyin felci dünyada ölüm sebepleri bakımından incelendiğinde 3. sırada yer alan ciddi bir hastalıktır (Lackland ve ark. 2014). Dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 4.7 milyon insan beyin felci yüzünden hayatını kaybetmektedir (Bramlett ve Dietrich 2004). Kuzey Amerika'da her 53 saniyede bir inme vakası meydana gelmektedir ve bu vakaların 3'te 1'i ölüm ile sonuçlanırken, hayatta kalanlar ise yaşamlarının geri kalanını ciddi nörolojik eksikliklerle sürdürmek zorunda kalmaktadır (Michaud ve ark. 2001). Bunlara ek olarak, inme sonrası gerçekleştirilen iyileştirme ve rejenerasyon çalışmaları ciddi bir ekonomik yük getirmektedir. Genelde 65 yaşın üzerinde beyin felci insidansında bir artış gözlemlenmesine rağmen yeni doğanlarda ve çocuklarda da görülebilmektedir (Berge ve ark. 2017). Bu denli önemli ve ciddi olan bir hastalığın bu zamana kadar bilinen ve kanıtlanmış tek tedavi yöntemi beyin felcinin başlangıcından itibaren ilk 3 saat içerisinde uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü (tPA) tedavisidir (Hanselman 2014).

İskemik hasarın şiddeti kadar süreside gelişen hasar üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır. Örneğin kısa süreli iskemi glia ve kan damarlarında gözlenen küçük hücresel değişikliklere sebep olurken kısa süreli bir nöronal hasara da sebep olabilir (Pulsinelli ve ark. 1982). Bununla beraber daha uzun süreli iskemi vakalarında enfarktüs üreten diğer hücre tipleriyle beraber ciddi nöronal ölümlere ve inflamasyonun tetiklenmesine neden olabilmektedir (Bramlett ve Dietrich 2004, Zhu ve ark. 2017).

2.1.1. Beyin Felci Patofizyolojisi

Beyni besleyen damarların tıkanması veya yırtılması sonucu beyne yeteri miktarda oksijen ve glikoz gidememektedir Buna bağlı olarak beyinde karmaşık sinyal yolları ve mekanizmalar devreye girerek hasar oluşumuna neden olmaktadır. Beyin felci sonrasında hasarın olduğu alan patofizyolojik açıdan iki farklı bölümde incelenmektedir (Durukan ve Tatlısumak 2007, Catanese ve ark. 2017, Şekil 2.1.1.). Hasarlı alanın orta kısmı iskemik kor bölgesini oluşturur. Kor

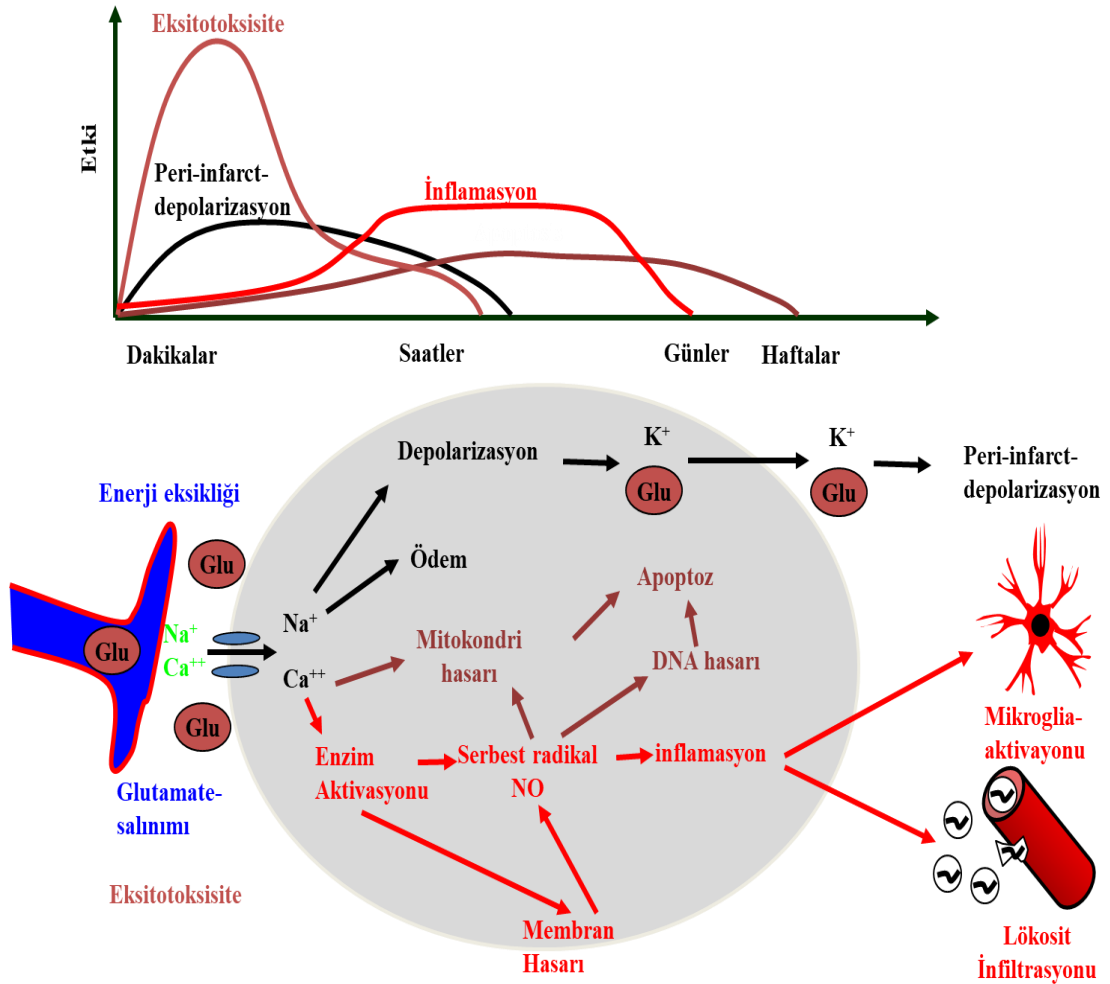
bölgesinde kan akımı önemli ölçüde azalmıştır ve hızlı bir nekrotik hücre ölümü başlamıştır. Hasarlı bölgenin etrafını çevreleyen bölge ise penumbra bölgesi olarak adlandırılır. Geçiş bölgesi olarak da bilinen penumbra bölgesindeki kan akımı kılcal damarlar vasıtasıyla iskemik kor bölgesine göre daha iyi durumdadır. Apoptotik hücre ölümünün baskın bir şekilde görüldüğü penumbra bölgesinde ayrıca yaşanan iyonik dengesizliğe karşı aktiviteler gözlemlenmektedir. (Dirnagl ve ark. 1999, Klehmet ve ark. 2009). Beyin felci sonrası yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu penumbra bölgesinde yaşam ile ölüm arasında kalan hücreleri kurtarmak üzerine yoğunlaşmıştır. Buradaki hücreler iskemiden dolayı kısıtlı seviyede bulunan oksijen ve glikoz molekülü kullanmaya çalışır. Aynı zamanda hücre içi sinyal yollarından özellikle sağkalım kinazları hücrelerin sağkalım sürecine katkı sunmaya çalışmaktadır (Astrup ve ark. 1981, Yao ve ark. 2001, Zechariah ve ark. 2013).



Şekil 2.1.1.1. Beyin felci sonrası gelişen iskemik kor ve penumbra bölgesi.

Beyne giden damarların tıkanması sonucu, damarın beslediği bölgedeki nöronların, yetersiz oksijen ve glikoz düzeyine bağlı olarak, enerji metabolizması bozulmaktadır (Paschen 1996, Gascon ve ark. 2008). Oluşan enerji eksikliğine bağlı olarak hücreler membran potansiyelleri kaybetmeye başlamakta ve ekstrasellüler ortama glutamat salınımı yapmaktadır. Bu olay beyin felci patofizyolojisinde eksitotoksisite olarak isimlendirilmektedir (Paschen 1996, Gascon ve ark. 2008). Eksitotoksisiteye bağlı olarak ortamda biriken glutamat post-sinaptik nöronda bulunan glutamat bağımlı NMDA (N-metil- D-aspartat) ve AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metilisoksal-4 propionik asit) reseptörlerini uyararak hücre içerisine

pozitif yüklü iyonların girmesine neden olmaktadır (Camacho ve Massieu 2006, Shohami ve Biegon 2014). Hücre içine giren Na^+ iyonu post-sinaptik nöronun membran potansiyelini kaybetmesine ve tekrardan ekstrasellüler ortama glutamat ve K^+ iyonlarının verilmesine neden olarak hasar alanında elektriksel değişikliklere yol açmaktadır (Dirnagl ve ark. 1999). Hasar alanında yaşanan bu kontrolsüz şarj ve deşarjlar, hasar çevresi depolarizasyonu olarak isimlendirilmektedir. Nitekim beyin felci sonrası gelişen hasarın yaklaşık %20'sinden bu durumun sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Hossmann 1996, Dirnagl ve ark. 1999). Hücre içine giren Na^+ iyonu aynı zamanda hücreler arası sıvıdan hücrenin içine Cl^- iyonlarının girmesine neden olmaktadır. Bu sebeple hücre içinde oluşan tuz, hücre dışından içine doğru su moleküllerini çekerek sitotoksik ödeme neden olmaktadır (McBride ve ark. 2016).



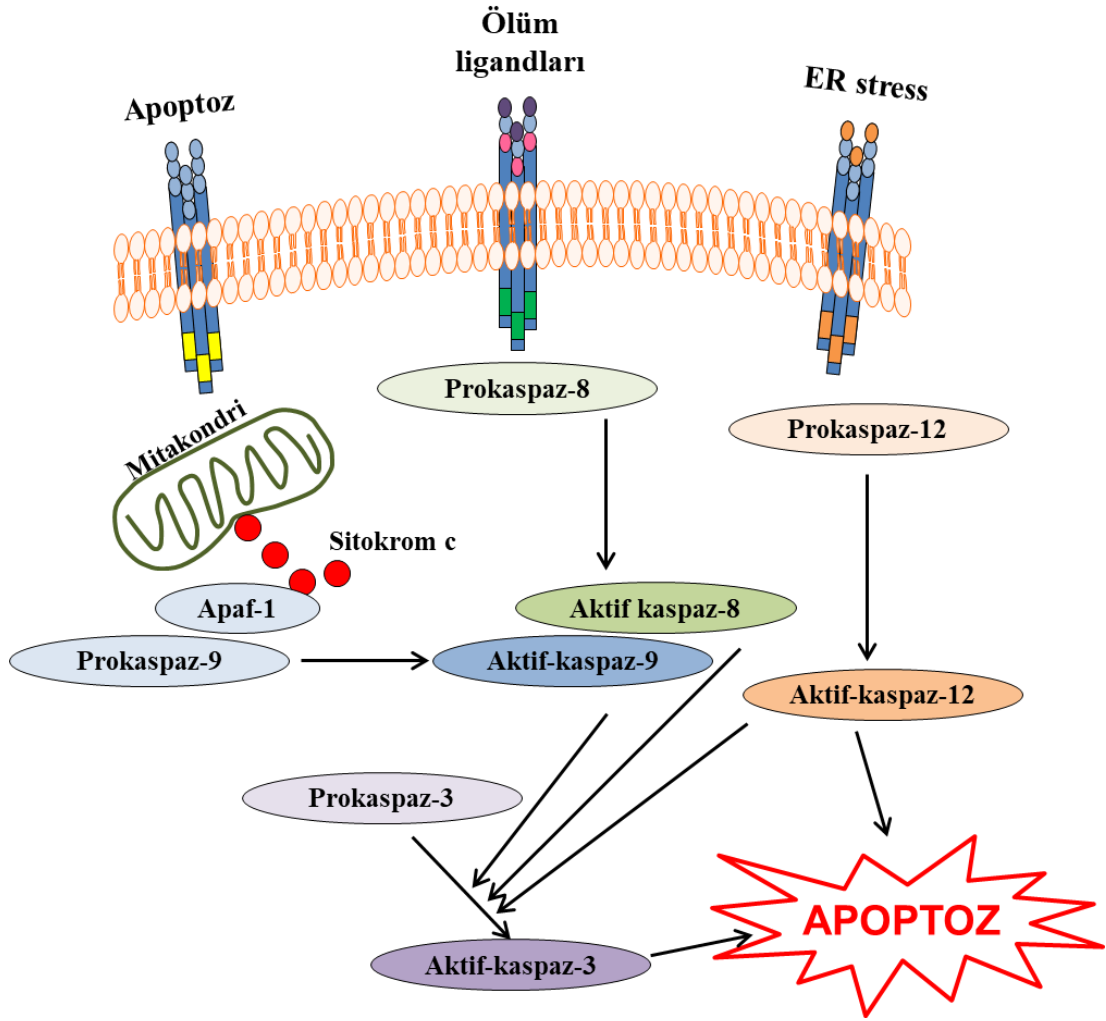
Şekil 2.1.1.2. Beyin felci sonrası gelişen patofizyolojik süreçlerin şematik gösterimi.

Hücre içine giren bir diğer iyon ise Ca^{+2} iyonudur. Hücre içinde artan Ca^{+2} çeşitli enzimleri aktive ederek hücre membranına hasar vermesinin yanı sıra serbest radikallerin oluşumunu da tetiklemektedir (Yamasaki ve ark. 1995, Muralikrishna Adibhatla ve Hatcher 2006). Devam eden patofizyolojik süreçte lökosit infiltrasyonu ve mikroglia aktivasyonuna bağlı olarak inflamasyon tetiklenmektedir (Kunimatsu ve ark. 2011, Liu ve ark. 2015).

Beyin felcini takip eden 24 saat içerisinde gerçekleşen mikroglia aktivasyonu interleukin- 1β (IL- 1β) seviyesini artırarak beyin hasarının artmasına neden olmaktadır (Doyle ve ark. 2008). Bunun yanı sıra, artan Ca^{+2} ve inflamatuvar nitrik oksit (NO); mitokondri hasarına ve DNA kırıklarına yol açarak, hücrede apoptoz sinyal yolağının aktifleşmesine ve dolayısıyla programlı hücre ölümüne neden olmaktadır (Dirnagl ve Endres 2014).

2.1.2. Beyin Felci Sonrası Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizması

Beyin felcinin tetiklenmesiyle dokuya substratların özellikle de oksijen ve glukozun yeteri miktarda ulaşması kısıtlandığı için nöronların iyonik dengesi bozulmaktadır (Dirnagl ve ark. 1999). Serebral iskemi sonrası hızlı bir şekilde enerji kaybı, hücrelerin depolarize olmasına ve hücre içi Ca^{+2} miktarının artışına neden olarak intrinsik apoptoz sinyal yolağı dahil olmak üzere birçok sitoplazmik ve nükleer olaylar zincirini başlattığı düşünülmektedir (Mergenthaler ve ark. 2004, Broughton ve ark. 2009). Hücre içi kalsiyum seviyesinin artması kalpainleri aktive eder ve Bid proteininin kırılarak tBid formuna dönüşmesini sağlamaktadır. Mitokondri membranında tBid, apoptotik proteinler olan Bad ve Bax proteinleri ile etkileşime girerek mitokondrial porların açılmasına ve sikokrom c (Cyt c) ve apoptoz tetikleyici faktör'ün (AIF) salınmasına yol açmaktadır. Sitozol içerisine yayılan Cyt c apoptotik protein aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan bu kompleks kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktive olmasına neden olmaktadır. Aktive olan kaspaz-3 nDNA tamir enzimlerinden adenosin difosfat (ADP)-riboz polimeraz (PARP) enziminin kırılmasına aracılık etmektedir. PARP' nin kırılmasıyla beraber DNA hasarı ve apoptoz tetiklenmektedir (Unal-Cevik ve ark. 2004, Zhu ve ark. 2005, Broughton ve ark. 2009).



Şekil 2.1.2.1. Beyin felci sonrası apoptotik hücre ölüm mekanizması.

2.1.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkisi

Fizyolojik koşullar altında, süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) içeren reaktif oksijen türleri (ROS), düşük seviyelerde üretilmektedir. Oluşan ROS, özellikle hücre içi sinyal yolları ve metabolik yollarında önemli rol oynamaktadır (Loh ve ark. 2006). Hücre içi ROS oluşumuna ksantin oksidaz, mitokondri elektron taşıma sistemi, araşidonik asit ve NADPH oksidaz katkıda bulunmaktadır (Kinuta 1989, Genovese ve ark. 2011, Meng ve ark. 2014). Hücrel ROS düzeyleri süperoksit dismutazlar (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon ve katalaz gibi endojen antioksidanlar tarafından kontrol edilmektedir (Sugawara ve Chan 2003).

Genel olarak iskemiye bağlı apoptozda rol oynayan ROS'un birincil kaynağının mitokondri olduğu dűşünülmektedir (Wu ve ark. 2008). Konuyla ilgili olarak, mitokondriyal ROS'un oluşumunda, hipoksinin kendisi, eksitotoksisite (glutamat) ve serebral iskemiden sonra aşırı Ca⁺² yűkű dahil olmak üzere çeşitli uyarılar tarafından üretildiği ifade edilmektedir (Sugawara ve Chan 2003). Ayrıca özellikle reperfüzyonun başlangıcında oksijen düzeyinde meydana gelen artışın mitokondriye bağlı ROS üretimini tetiklediği dűşünülmektedir (Morita-Fujimura ve ark. 2001). İnme sonrası dönemde, aşırı ROS üretimine bağlı olarak, Cyte' nin ve diğer apoptotik aktivatűrlerin sitozola salınmasına bağlı olarak apoptozun etkisinin artması söz konusu olabilir.

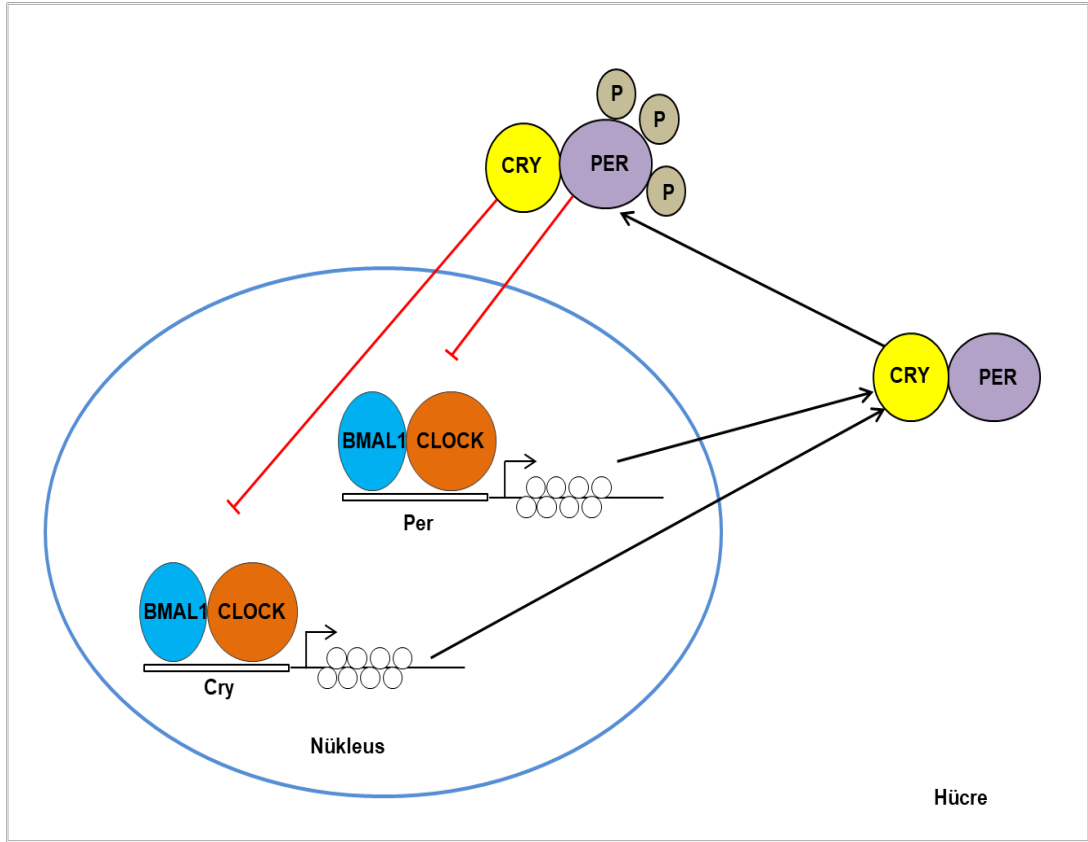
2.2. Sirkadiyen Ritim

Memelilerde biyolojik saatlerin en önemlilerinden biri gece-gündüz ritmini sađlayan sirkadiyen ritimdir. Sirkadiyen ritim sadece endojen uyku-uyanıklılık döngűsünü belirlemekle kalmaz aynı zamanda günlük davranıřları ve neredeyse tüm fizyolojik fonksiyonları etkileyen biyolojik bir saattir. Bu iç saat, aydınlık-karanlık, beslenme veya mevsimler deđiřiklikler gibi dıř faktűrlerden etkilenebilmektedir (Passero ve ark. 2000, Inagawa 2002). Bu dıř etkenlerle beraber 24 saatlik gün döngűsű oluřturulur. Bu biyolojik döngűye bađlı olarak vűcut fonksiyonları ve hormonlar etki göstermeye bařlamaktadır. Sirkadiyen ritim bařlıca anterior hipotalamusta bulunan supra kiazmatik nükleus (SKN) tarafından düzenlenmektedir (Mueller ve ark. 2011).

2.2.1. Sirkadiyen Ritmin Molekűler Mekanizmaları

Sirkadiyen ritim molekűler seviyede bir takım saat geninin aktivasyonu ile kontrol edilen biyolojik bir döngűdür. Sirkadiyen ritim ile alakalı birçok gen ve transkripsiyon faktűr tanımlanmıřtır, fakat Period1 (Per1), Period2 (Per2), Period3 (Per3), Cryptochrome1 (Cry1), Cryptochrome2 (Cry2) ve transkripsiyon faktűrleri Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput (CLOCK), Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (Bmal1) ve Neuronal PAS domain protein 2 (Npas2) öne çıkan üyelerdir (Robinson ve Reddy 2014, Albrecht 2017). Sirkadiyen salınımı bu faktűrlerin ifadeleri ile kontrol edilmektedir. Per ve Cry

genlerinin aktiviteleri Bmal1/CLOCK veya Bmal1/Npas2 heterodimerleri vasıtasıyla Per ve Cry genlerinin promoter bölgeleri içindeki E-kutusu bağlanma noktalarına bağlanarak kontrol edilmektedir (Xue ve ark. 2016, Jiang ve ark. 2016). Gen çeviri işleminden sonra Per ve Cry proteinleri heterodimerize olarak çekirdeğe geçmekte ve ardından CLOCK, Bmal1 ve Npas2'in transkripsiyon aktivitelerini baskılayarak kendileri aktivitelerinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Söz konusu negatif geribildirim mekanizması ile Per ve Cry genlerine ait protein ekspresyonundaki artış, ilerleyen süreçte kendi aktivitesini inhibe eden bir işleyişe dönüşmektedir. Cry ve Per proteinlerinin ifadelerinin maksimuma çıkması mRNA seviyelerinin maksimuma çıkmasından yaklaşık 6 saat daha geç gerçekleşmektedir. Bu faktörlere ek olarak çeşitli kofaktörler sirkadiyen saatin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Kazein Kinaz 1E (CK1E) Per proteinini fosforlayarak CLOCK ve Bmal1'in DNA'ya bağlanmasını engellemektedir. Ayrıca Rev/ Erb-alpha'nın baskılanmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.2.1.1. Per ve Cry genlerinin aktivitelerinin kontrolü.

2.2.2. Sirkadiyen Ritim Proteinlerinin Görevleri ve Fonksiyonları

Saat genleri, SKN dışındaki farklı beyin bölgelerinde de (hipokampus, striatum ve serebral korteks) ritmik şekilde salınım göstermektedir (Ko ve ark. 2010). Sirkadiyen ritmi düzenleyen proteinlerin, sağlıklı bir beyinde, homeostazı sağlamada, yeni nöron oluşumunu (nörogenezi) düzenlemede ve nörodejenerasyon sonrası iyileşme mekanizmalarında önemli roller aldığı gösterilmiştir (Goergen ve ark. 2002). Örneğin, Bmal1 proteininin moleküler teknikler vasıtasıyla silinmesiyle beyin çoğu bölgesindeki transkripsiyon paternini değiştirdiği görülmüştür. Hem global hem de beyin spesifik Bmal-1'i silinmiş hayvanlarda korteks bölgesinde nöropatolojik bulgulara rastlanmış ve sinaptik dejenerasyon, davranışsal anomaliler gözlenmiştir (Anea ve ark. 2012, Ratajczak ve ark. 2012). Bunlara ek olarak, oksidatif stres ve redox savunma genlerinin düzenlenme mekanizmalarının işlevini yitirdiği görülmüştür (Goergen ve ark. 2002).

Beyinde nörogenezin gerçekleştiği hipokampus seviyesinde sirkadiyen ritme bağlı olarak CLOCK genlerinin ekspresyonlarının düzenlendiği hem protein hem de RNA seviyesinde belirlenmiştir. Nörogenezin sirkadiyen ritmin karanlık periyodunda arttığı ve buna bağlı olarak öğrenme, büyüme ve hafıza gibi fonksiyonların söz konusu ritme bağlı gerçekleştiği yönünde çıkarımlar yapılmıştır (Bouchard-Cannon ve ark. 2013). Bu bilgilere ek olarak öncül sinir hücrelerinin bölünme hızlarının akşam ve gece süresince en uç seviyesine ulaştığı bilinmektedir. Bu durumun sirkadiyen ritme bağlı moleküller tarafından düzenlenip düzenlenmediğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda hipokampusta olgunlaşmamış öncül sinir hücrelerinin saat proteinlerini ürettiği bulunmuş ve ritimden sorumlu bazı genleri (Per-1, Per-2, Bmal-1) kalıtsal olarak silinmiş hayvanlarda nörogenezin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Zheng ve Sehgal 2010, Paul ve ark. 2012, Bouchard-Cannon ve ark. 2013).

Sirkadiyen ritme bağlı olarak günlük döngünün ayarlanmasında saat proteinlerinin post transkripsiyonel modifikasyon edilmeleri önemli bir aşamadır. Period proteininin fosforlanması bu süreçte önemli adımlardan biridir. Period proteininin sitoplazmadan nükleusa translokasyonu bu modifikasyonla gerçekleşir. Nükleusa transfer olan Period döngünün baştan başlamasını sağlar. AKT/ mTOR

sinyal yolağının elemanlarından biri olan kinaz proteini GSK-3- α/β 'nın bu süreçte görevli olduğu düşünölmektedir (Ko ve ark. 2010). Ayrıca AKT/ mTOR sinyal yolaklarının biyolojik saatin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Zheng ve Sehgal 2010). AKT aktivasyonu GSK-3- α/β 'yı inhibe ederek Period proteinlerinin nukleusa geçişlerini yavaşlatarak döngüyü uzatabilir. Bu durum, genetik olarak susturulmuş hayvan çalışmalarında gözlenen nörogenezdeki artışın başka bir açıklaması olabilir.

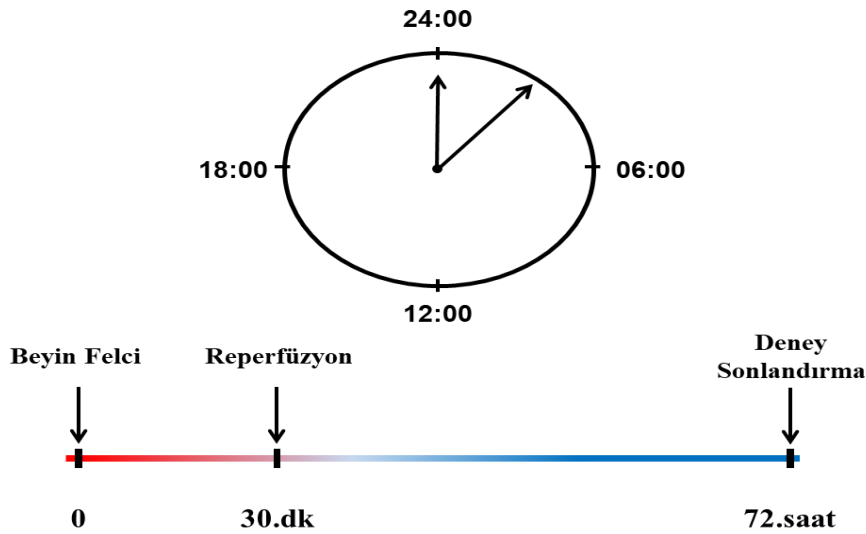
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Dizaynı ve Gruplar

Bu çalışma etik standartlara, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmış olup Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29.04.2016 tarihli 2016-021 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmada 8-12 haftalık ve 20-25 gr ağırlığında olan erkek Balb/ c fareleri kullanılmıştır.

Deney hayvanları 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsü esas alınarak; 6 saatlik aralıklara göre 4 farklı gruba ayrıldı. Deney hayvanlarının ışıklarının açıldığı ilk zaman “Zeitgeber zaman-0” (ZT0) olarak isimlendirilmektedir. Buna göre;

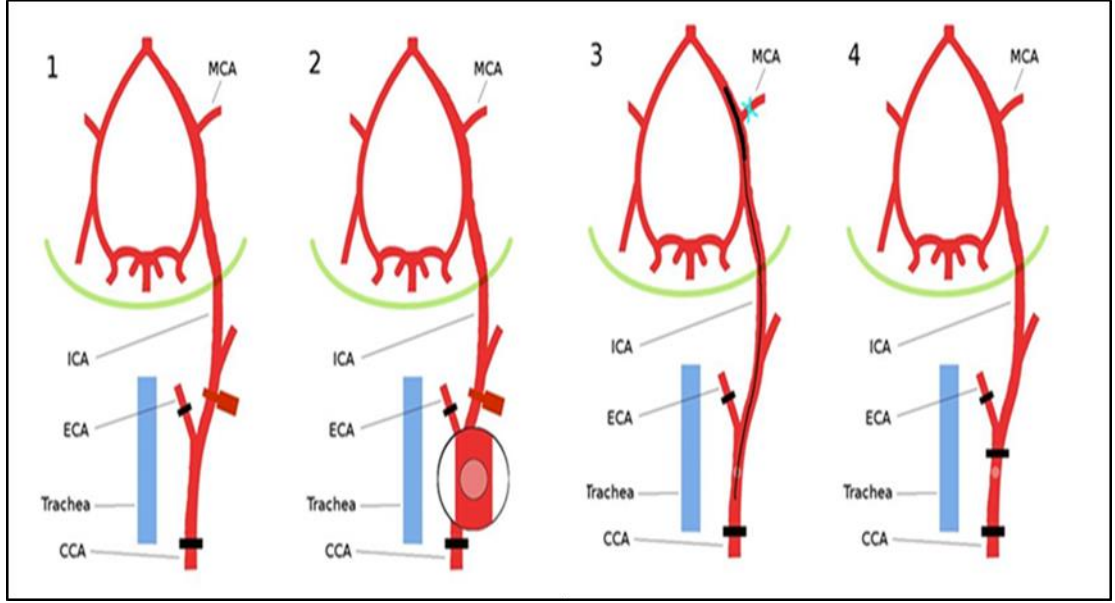
- Grup-1: ZT0 (Işıkların açıldığı an, 06:00) 30dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon. (n=7)
- Grup-2: ZT6 (Işıklar açıldıktan 6 saat sonrası, 12:00) 30dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon. (n=7)
- Grup-3: ZT12 (Işıkların kapandığı an, 18:00) 30dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon. (n=7)
- Grup-4: ZT18 (Işıklar kapandıktan 6 saat sonrası, 24:00) 30dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon. (n=7)



Şekil 3.1.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak 30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon deney dizaynı.

3.2. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli

8-12 haftalık erkek Balb/C fareler gaz anestezi sistemi (%1 İzofluran (N0015A09, Adeka, Türkiye) (%30 O₂, kalanı N₂O) kullanılarak anesteziye alındı. Anestezi altındaki farelerin vücut sıcaklıkları homeotermik ısıtma sistemiyle (55-7020, Harvard Apparatus, Amerika Birleşik Devletleri) 36,5-37,0°C arasında tutuldu. OSA tıkanması metodunun kontrolü için beyin kan akımını anlık ölçen Laser Doppler' in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, İsveç) OSA bölgesinin beslediği noktaya (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direkt kafatası kemiği üzerine yerleştirildi. Beyin felci metodu filament tekniği kullanılarak yapılmıştır. Sırt üstü yatırılmış olan farelerin boyun üzerinde deriye küçük bir kesi yapılmıştır. External ve sol common karotid arterler izole edildikten sonra 7,0 ipek dikiş ipliğiyle bağlanıp, bir mikrovasküler klips (FE691, Aesculap, Almanya) internal karotid arter üzerine yerleştirildi. OSA girişini tıkamak için 8,0 naylon monofilament (Ethilon; Ethicon, Almanya) silikon ile kaplanarak (Xantopren, Bayer Dental, Japonya) çapı 180-190 µm'ye çıkarıldı. Common karotid artere küçük bir kesik yapıldıktan sonra önceden hazırlanmış olan silikon kaplı filament birurkasyo karotikumdan itibaren direnç hissedilinceye kadar internal karotid arter içerisinde yaklaşık olarak 9 mm distal yönde ilerletildi (Şekil 3.2.) (2016). 30 dk sonra silikon kaplı filament geri çekilerek OSA bölgesine tekrardan kan akışı sağlanmıştır. Reperfüzyonun kontrolü amacıyla LDF kayıtları 20 dk süresince izlenmiştir. Açılan yara 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan, Türkiye) ile kapatıldıktan sonra anesteziye son verilerek fareler kendi kafeslerine geri bırakılmıştır.



Şekil 3.2.1. Farelerde OSA tıkanması metodu.

3.3. Cryostat Cihazı ile Beyin Kesimi

30 dk beyin felci sonrası 72 saat reperfüzyon sonrasında fareler yüksek doz anestezi kullanılarak sakrifiye edildi. Hızlı bir şekilde beyinler çıkarılıp kurubuz üzerinde dolduruldu. Beyinler Cryostat cihazı (CM1950, Leica, Almanya) kullanılarak kesildi. İmmünfloresan boyamalar için striatum seviyesinden (Bregma 0) 18 μ m kalınlığında koronal kesitler pozitif yüklü lamalar üzerine alındı. Ayrıca protein çalışmaları (Western Blot ve Proteomik analizi) için yine striatum seviyesinden doku örnekleri alındı.

3.4. NeuN Boyaması

Striatum seviyesinden alınan beyin kesitleri oda sıcaklığında %4 paraformaldehit (PFA) ile fikse edildikten sonra 3 kere 5 dk süresince çalkalayıcı üzerinde 0.1M fosfat buffer saline (PBS) ile yıkandı. Bloklama aşaması için 0.1M PBS içerisinde %0.3 Triton X-100 ve %10 normal keçi serumu (NGS; G9023, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak hazırlandı ve örneklerin üzerine eklendi. Bloklama aşaması oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 1 saat olarak gerçekleştirildi. Bloklama aşamasından sonra örnekler 3 kere 5 dk süresinde 0.1M PBS ile yıkandıktan sonra bir gece +4°C' de Alexa Fluor 488 ile birleştirilmiş

monoklonal anti-NeUN (Mab377X, Chemicon, Amerika Birleşik Devletleri) ile inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra örnekler oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 3 kere 5 dk süresince 0.1M PBS ile yıkandı. Son olarak hücrelerin çekirdeklerini görüntüleyebilmek için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) ile çekirdek boyaması yapıldı ve örnekler sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak lamel ile kapatıldı. Örnekler daha sonra Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Almanya) mikroskobu kullanılarak analiz edildi. İskemik striatumdan ve kontralateral striatumdan belirlenen 62,500 μm^2 'lik 9'ar farklı alandan NeuN ve DAPI pozitif hücreler analiz edildi. İpsilateral hemisferden elde edilen sonuçlar kontralateral hemisfere göre oranlandı (Beker ve ark. 2017).

3.5. DNA Fragmantasyonu

Sirkadiyen ritme bağlı olarak apopitotik hücre analizi için terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL; 11684795910, Roche, Amerika Birleşik Devletleri) kiti kullanıldı. Beyin felci sonrası bregma seviyesinden alınan koronal kesitler % 4'lük PFA ile fikse edildi. Sonrasında PFA'yı dokudan uzaklaştırmak için kesitler 3 kere 5 dk süresince 0.1 M PBS ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı engellemek için örnekler normal keçi serumu (NGS; G9023, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak bloklama aşaması yapıldı ve örnekler 30 dk süresince oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklere TUNEL karışımı eklenerek 60 dk süresince 37°C' de reaksiyona sokuldu. TUNEL reaksiyonunu durdurmak için inkübasyon sonunda örnekler 3 kere 5 dk süresince 0.1 M PSB ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında yıkandı. Son olarak hücrelerin çekirdeklerini görüntüleyebilmek için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) ile çekirdek boyaması yapıldı ve örnekler sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak lamel ile kapatıldı. Örnekler daha sonra Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Almanya) mikroskobu kullanılarak analiz edildi (Beker ve ark. 2017).

3.6. Western Blot ile Protein Analizi

Western Blot ile protein analizi yapabilmek için beyinlerden alınan doku örneklerinden protein izolasyonu yapıldı.

3.6.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için 30 dk iskemiden 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyinlerinden ipsilateral striatum seviyesinden doku örnekleri alındı. Aynı gruptaki örnekler bir araya getirilerek protein izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin üzerine proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5782, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) ilave edilmiş olan ripa tampon çözeltisi (R0278-50ML, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi ve örnekler manyetik homojenize edildi.

3.6.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü

Örneklerin protein konsantrasyonları Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen Life Technologies Corporation, Amerika Birleşik Devletleri), ve Qubit 2.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen Life Technologies Corporation, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak hesaplandı. Qubit cihazının kalibrasyonu için kullanılan üç farklı standart karışımı ve protein ölçümü yapılacak olan 4 farklı grup (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) için Qubit protein tampon çözeltisi ve Qubit bileşimi kullanılarak örnekler hazırlandı. Örnekler vorteks edildikten sonra 15 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Qubit 2.0 cihazı kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.6.3. Jel Elektroforezi

Örneklerin (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) protein konsantrasyonu belirlendikten sonra her biri için 20 µg protein karışımı, 10 µl 2X Laemmlı tampon solüsyonu (161-0747, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) ve geri kalanı ddH₂O olacak şekilde 20 µl protein karışımı hazırlandı. Protein karışımı 5 dk süresince 95°C' de inkübe edildikten hemen sonra örnekler +4°C buz üzerine alındı.

Mini-Protean TGX Precast protein jeli (4569033, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) elektroforez tankına (1658004, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) yerleştirildi. Elektroforez tampon solüsyonu (25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) tankın içerisine eklendi. Yükleme yapılabilmesi için jel üzerinde bulunan taraklar çıkartıldı ve kuyular tampon çözeltisi vasıtasıyla temizlendi. Jel elektroforezinin süresini belirleyebilmek için belirli ağırlıklarına göre belirli proteinleri işaretlenmiş olan Protein-All-Blue (163-0393, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) protein işaretleyicisi kullanıldı. Örnekler ve protein işaretleyicisi jele yüklendikten sonra güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak elektroforez başlatıldı. Proteinlerin jel içerisindeki ayrışmaları protein işaretleyicisi vasıtasıyla takip edildi (Beker ve ark. 2015).

3.6.4. Jelden Membrana Protein Transferi

Elektroforez sonunda jeller tanktan alındı ve jelin etrafında bulunan plastik koruyucular kırıldı. Sorasında jel üzerindeki proteinler PVDF (Poli-viniliden florür) membrana (162-0174, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) transfer edebilmek için transfer tampon solüsyonu (170-4272, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) hazırlandı. PVDF membran ve filtre kâğıtları (162-0219, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri), hazırlanan transfer tampon solüsyonu içerisinde ıslatıldıktan sonra Trans-blot turbo transfer sistemi (1704155, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinler jelden PVDF membrana aktarıldı (Beker ve ark. 2015).

3.6.5. Antikorlar ile Protein Analizi

Jelden PVDF membrana transfer işleminden sonra PVDF membran 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris salin) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology, Amerika Birleşik Devletleri) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. TBS-T ile yıkanan membranlar bir gece monoklonal Bmal1 (14020, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri),

monoklonal CLOCK (5157, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri), poliklonal Anti-Per1 (ab3443, Abcam, Amerika Birleşik Devletleri), poliklonal Anti-Per2 (ab180655, Abcam, Amerika Birleşik Devletleri), monoklonal fosforlanmış p53 (2524, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) antikoları ile inkübe edildi. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu içerisinde Horseradish Peroksidaz enzimi ekli olan ikincil antikor (31460, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) verildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilen membranlar inkübasyon sonunda üç kere TBS-T ile yıkandıktan sonra 5 dakika ECL Western görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) ile inkübe edilen membranlar Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) görüntülendi.

3.6.6. Western Blot Ölçümü

Western Blot sonunda elde edilen membran görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health, Amerika Birleşik Devletleri), yardımıyla yoğunluk farkına göre analiz edildi.

3.7. Pathscan Protein Analizi

Akt sinyal yolağı analizi için immunoserolojik bir yöntem olan Pathscan Akt sinyal yolağı antikor kiti (9474, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) uygulandı. Kitin içinden çıkan ve üzerinde antikoların olduğu cam ile plastik birleştiriciler üreticinin tarif ettiği şekilde birleştirildi. Her bölmeye 100 µl bloklama tampon solüsyonu eklendi ve 15 dk süresince oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Her bir örnek için (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) 75 µg protein bölmelere eklendi ve bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, örnekler 75 µl antikor tespit kokteyli eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bölmeler 100 µl temizleme solüsyonu ile 4 kere orbital çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Sonrasında örneklerin üzerine 75 µl horse radish peroxidase (hrp) ile bağlanmış streptavidin eklendi ve örnekler 30 dk süresince oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra örnekler tekrardan 4 kere temizleme çözeltisi ile orbital çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Antikoları tespit edebilmek için örnekler LumiGLO/peroxide görüntüleme

solüsyonu ile muamele edildi ve Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak görüntülendi. Elde edilen protein görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health, Amerika Birleşik Devletleri), yardımıyla analiz edildi.

3.8. Proteomiks

3.8.1. Protein Ekstraksiyon Protokolü

İskemik striatum seviyesinden alınan doku örnekleri tartıldı. Kullanılacak olan UPX kitinin (Universal Protein Extraction Kit, Expedeon, Almanya) içine proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5782, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi. Dokuların üzerine 500 µl UPX solüsyonu eklendikten sonra örnekler homojenize edildi. Sonrasında örnekler 95°C' de 5 dk inkübe edilen örneklerin tekrardan oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığına gelen örnek yaklaşık 1 saat süresince +4 °C'de bekletildikten sonra 15,000g'de 10 dk süresince santrifüj edildi. Supernatant kullanılmak üzere ayrı bir tüpe alındı ve -80 °C'de saklandı.

3.8.2. FASP Protokolü

Beyin felci sonrası iskemik striatumdan alınan beyin dokuları homojenize edildikten sonra Qubit cihazı ile protein konsantrasyonları belirlendi. Bütün gruplar için (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) 100 µg protein 30 µl LC-su içerisinde hazırlandı. 200 µl üre çözeltisi ile karıştırılan örneklerin tamamı filtreli tüplere eklenerek 14,000 g'de 15 dk süresince santrifüj edildi. Sonrasında tekrardan filtrenin üzerine 200 µl üre eklenerek bir 14,000 g'de 15 dk santrifüj tekrar edildi. Sıvı kısım atıldı ve filtrede kalanların üzerine 100 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklendi ve filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Filtreye 75 µl tripsin solüsyonu eklenerek filtreye kısaca bir vorteks yapıldı. Üzeri parafilm ile kapatılan örnek 1 dk süresince çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonrasında filtre bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün filtre yeni bir tüpe alınır ve üzerine 40 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklendi ve filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu aşama bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında filtreye 50

μ l 0.5 mM Sodyum Klorit solüsyonu ilave edildi ve filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Solüsyon içerisinde gruplara ait peptit karışımları elde edildi.

3.8.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Lc-Ms/Ms) Analizi

LC-MS / MS analiz ve sonraki protein tanımlamaları daha önce yayınlanmış bir protokole göre yapılmıştır. Triprik peptitler SYNAPT2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfına yüklenerek hesaplanmıştır. Kolonlar % 97 mobil faz A (%0.1 FA içeren UHPLC'li su) ve sıcaklık 55 °C' ye ayarlandı. Peptitler analitik kolona trap kolondan (Symmetry C18, 5 μ m, 180 μ m i.d. \times 20 mm, Waters), analitik kolona 90 dk dereceli ayrıştırma ile trap kolonundan (CSH C18, 1,7 μ m, 75 μ m i.d. \times 250 mm, Waters) ayrıştırılmıştır. Bu ayrıştırma işlemi % 0,1 FA (v/v) içeren, gradyenti %4'den %40'a olan ACN ile dakikada 0.400 μ l akış hızıyla yapılmıştır. MS ve MS/ MS taramalarının pozitif iyon modu ile 0.7 saniyelik döngülerle taramalar yapıldı. On volt düşük çarpışma enerjisi ve 30V yüksek çarpışma enerjisi olarak ayarlandı. İyonlar, iyon hareketlilik ayrımı (IMS) ile ayrılmıştır. Dalga hızı, tam IMS döngüsü boyunca 1000'den 55 m/ s' ye yükseltildi. Hareket kabiliyeti için serbest bırakma süresi 500 μ s, trap yüksekliği 15 V olarak ayarlandı. IMS dalga gecikmesi, kapanın serbest bırakılmasından sonra hareketlilik ayrımı için 1000 μ s idi. Prekürsör iyon ön seçimi olmaksızın, 50-1900 m / z aralığındaki tüm iyonlar çözünürlük modunda parçalandı. Buna ek olarak, 100 fmol/ μ lGlu-1-fibrino peptit B, 60 saniyelik bir aralıkla kilitli kütle referansı olarak verildi. Peptidleri tanımlamak ve teşhis etmek için proteomik yazılım için Progenesis-QI (Waters) kullanıldı (Hacariz ve ark. 2014, Serhatli ve ark. 2014).

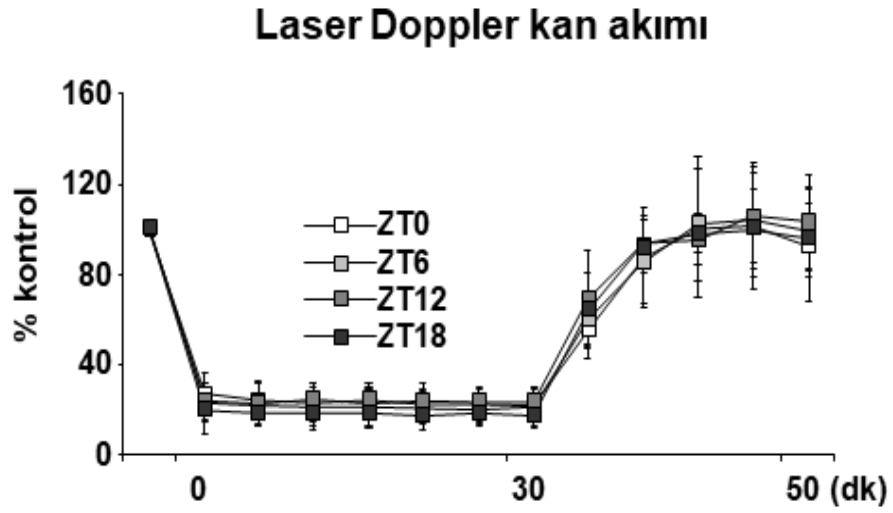
3.9. İstatistiksel analizler

Nöronal sağkalım, Western blot ve Pathscan Protein Analizi verileri tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi ve gruplar arasındaki farklılık LSD testi ile analiz edildi. LC-MS/MS verileri için ise bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) kullanıldı ve ZT0 ve ZT18 arasında 1.4 katlık değişim istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edildi. OSA ve reperfüzyon ile elde edilen veriler de independent samples t testi ile analiz edildi. Bütün bulgular ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. P değeri 0.05'den olanlar veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Laser Doppler Kan Akımı

Beyin felci operasyonlarının güvenilirliğini ve tekrar edilebilirliğinin kontrolü için 30 dk OSA tıkanması öncesinde, sırasında ve reperfüzyon başlangıcında OSA'in beslediği striatum bölgesinden (Bregma -2 mm posterior; 6mm lateral) gerçek zamanlı olarak LDF kaydı alındı (Şekil 4.1.).

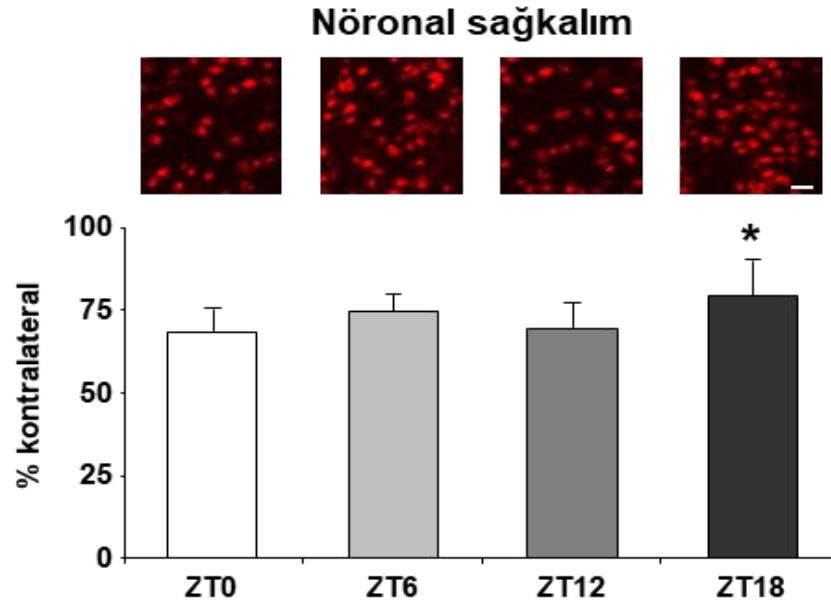


Şekil 4.1.1. Beyin felci sırasında ve reperfüzyon başlangıcında Laser Doppler kan akımı.

Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral bölgesinden alınan beyin kan akımına göre; filament tekniği ile OSA girişinin tıkanması sonucu beyin kan akımı ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18 gruplarında operasyon öncesine göre yaklaşık olarak % 20 oranında azalmıştır. Beyin kan akımları beyin felci esnasında sabit kalmıştır ve filamentin geri çekilmesi ile beraber beyin kan akımı tekrardan artmaya başlamıştır. ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18 gruplarının beyin kan akımları arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

4.2. Nöronal Sağkalım Analizi

Striatum seviyesinden cryostat vasıtasıyla alınan koronal kesitlere hücreyel sağkalım analizi için NeuN boyaması yapıldı. İpsilateral ve kontralateral striatumdan belirlenen 9 farklı alandan hücre sayımı yapılarak nöronal sağkalım hesaplandı.

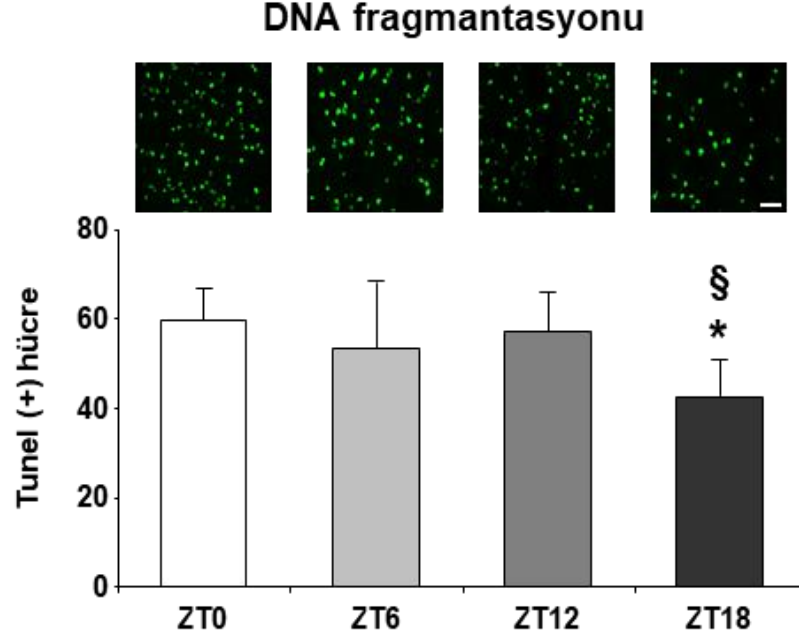


Şekil 4.2.1. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda hücreyel sağkalım analizi sırasıyla ZT0 grubu 68.3 ± 7.1 , ZT6 grubu 74.5 ± 5.4 , ZT12 grubu 70.4 ± 7.6 , ZT18 grubu 79.1 ± 11.6 olarak hesaplandı. ZT18 grubu ZT0 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde hücreyel sağkalımın arttığı gösterildi.

4.3. Apoptotik Hücre Analizi

30 dk OSA tıkanması sonrası 72 sat reperfüzyon yapılan farelerden alınan 18 µm kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine TUNEL boyaması yapıldı. Konfokal mikroskop kullanılarak iskemik striatumda apoptotik hücre analizi yapıldı.

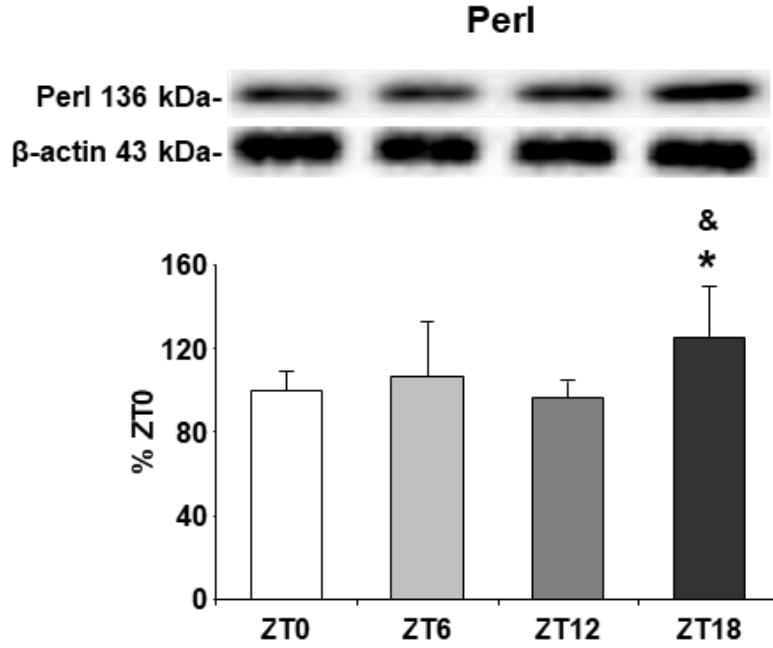


Şekil 4.3.1. TUNEL boyaması ile iskemik striatumdan apoptotik hücre ölümü analizi. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. *p<0.05 ZT0 grubuna göre, §p<0.05 ZT6 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

İskemik striatum seviyesinden her biri 62,500 µm² olan 9 farklı alandan apoptotik hücreler sayıldı. Deney gruplarında sayılan ortalama apoptotik hücre sayıları; ZT0 grubu 59.5 ± 8.2, ZT6 grubu 53.4 ± 17.0, ZT12 grubu 57.1 ± 8.6 ve ZT18 grubu 42.6 ± 9.3 olarak hesaplandı. ZT18 grubu ZT0 ve ZT6 grubuna göre kıyaslandığında apoptotik hücre sayısını anlamlı seviyede azalttığı gözlemlendi.

4.4. Per1 Protein Analizi

Striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden Western Blot tekniği kullanılarak sirkadiyen ritim proteini Per1'in ifadesi analiz edildi.

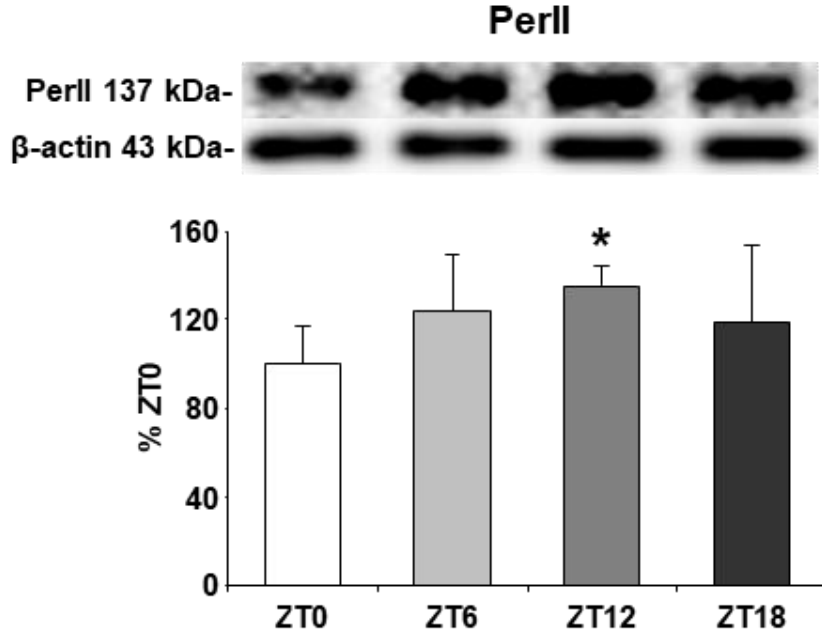


Şekil.4.4.1. Sirkadiyen ritim proteini Per1'in Western Blot ile analizi. Normalizasyon için β-Actin kullanıldı. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3 blot/ protein) *p<0.05 ZT0 grubuna göre, &p<0.05 ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

İskemik striatumda ölçülen Per1 protein seviyeleri ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; ZT0 grubu 100.0 ± 9.1 , ZT6 grubu 107.0 ± 25.9 , ZT12 grubu 96.7 ± 7.0 ve ZT18 grubu 125.3 ± 26.4 olarak hesaplandı. ZT0 ve ZT6 gruplarına göre kıyaslandığında Per1 protein seviyesi ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gösterildi.

4.5. Per2 Protein Analizi

İskemik hemisferin striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden Western Blot tekniği kullanılarak sirkadiyen ritim proteini Per2'nin ifadesi analiz edildi.

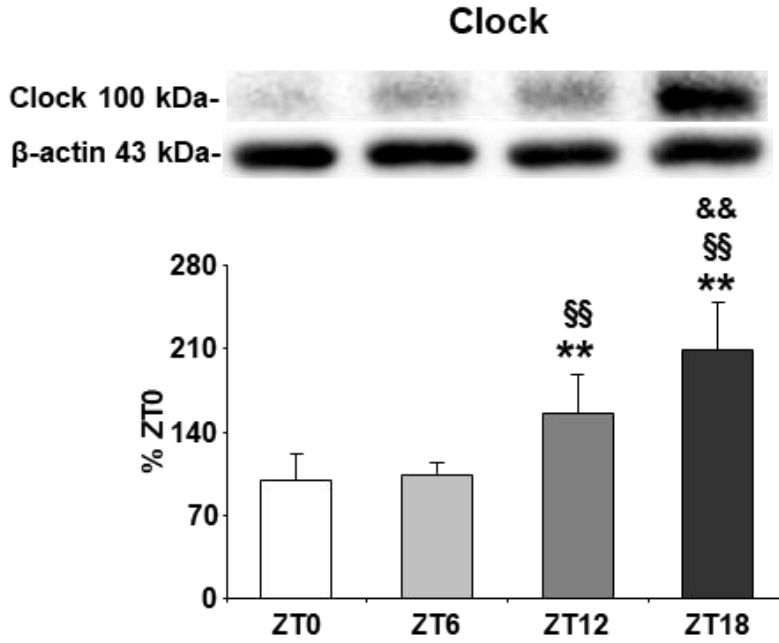


Şekil 4.5.1. Sirkadiyen ritim proteini Per2'nin Western Blot ile analizi. Normalizasyon için β-Actin kullanıldı. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3 blot/ protein) *p<0.05 ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

İskemik striatumda ölçülen Per2 protein seviyeleri ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; ZT0 grubu 100.0 ± 18.4 , ZT6 grubu 124.5 ± 26.8 , ZT12 grubu 135.6 ± 10.2 ve ZT18 grubu 118.9 ± 36.4 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre ZT12 grubu ile ZT0 grubu kıyaslandığında Per2 protein ifadesinin ZT12' de istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gösterildi.

4.6. CLOCK Protein Analizi

30 dk OSA tıkanması sonrası 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden Western Blot tekniği kullanılarak sirkadiyen ritim temel proteinlerinden biri olan CLOCK proteinin seviyesi analiz edildi.

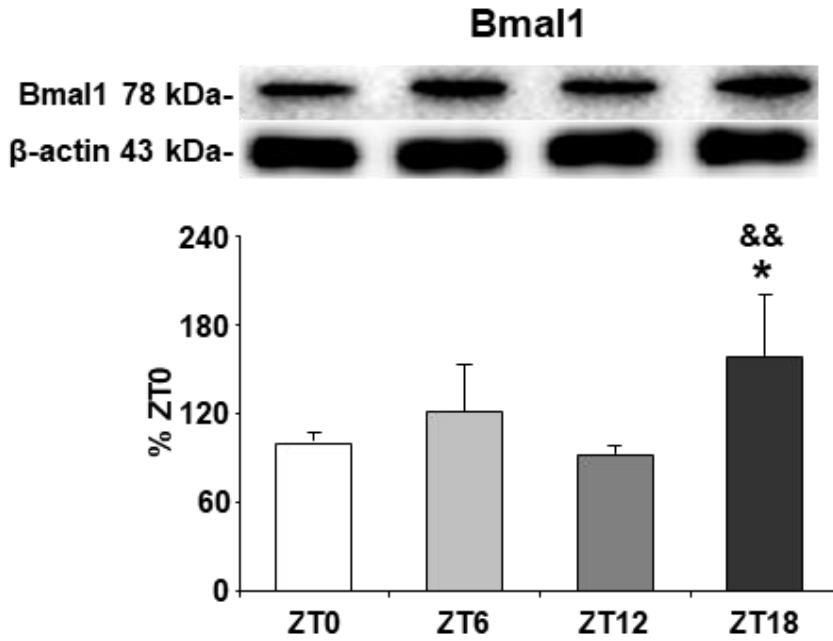


Şekil 4.6.1. Sirkadiyen ritm proteini CLOCK seviyesinin Western Blot ile analizi. Normalizasyon için β-Actin kullanıldı. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3 blot/ protein) **p<0.01 ZT0 grubuna göre, §§p<0.01 ZT6 grubuna göre, &&p< 0.01 ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

İskemik striatumda ölçülen CLOCK protein seviyeleri ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; ZT0 grubu 100.0 ± 21.9 , ZT6 grubu 103.6 ± 9.3 , ZT12 grubu 155.0 ± 33.5 ve ZT18 grubu 209.3 ± 40.9 olarak hesaplandı. Elde edilen bulgulara göre CLOCK protein seviyesi hem ZT0 hem de ZT6 grubuna göre kıyaslandığında ZT12 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede arttığı gözlemlendi. Ayrıca CLOCK protein ifadesi ZT0, ZT6 ve ZT12 grupları ile kıyaslandığında ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gözlemlendi.

4.7. Bmal1 Protein Seviyesi

30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden Western Blot tekniği kullanılarak sirkadiyen ritim temel proteinlerinden biri olan Bmal1 proteinin seviyesi analiz edildi.

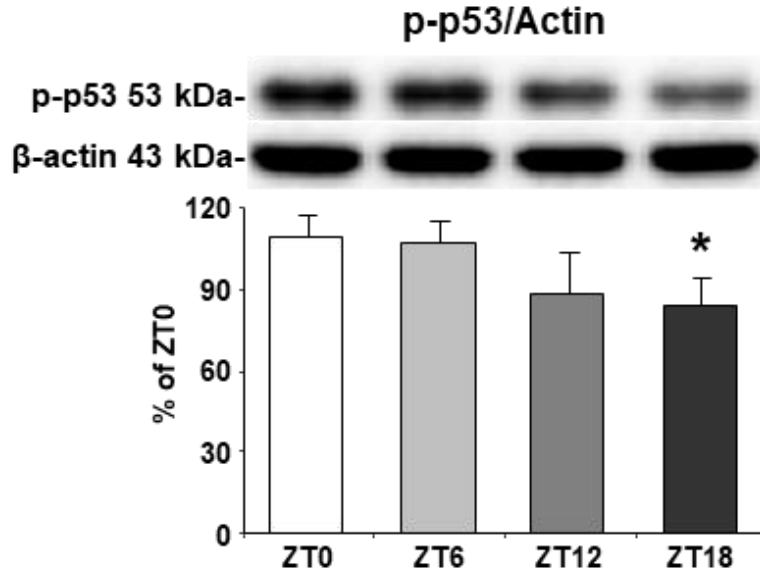


Şekil 4.7.1. Sirkadiyen ritm proteini Bmal1'in Western Blot ile analizi. Normalizasyon için β-Actin kullanıldı. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3 blot/ protein) *p<0.05 ZT0 grubuna göre, §§p<0.01 ZT12 grubuna göre, &&p< 0.01 ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

İskemik striatumda ölçülen Bmal1 protein seviyeleri ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; ZT0 grubu 100 ± 9.2 , ZT6 grubu 120.8 ± 44.6 , ZT12 grubu 93.1 ± 6.5 ve ZT18 grubu ise 158.8 ± 59.1 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ZT18 grubunun hem ZT0 grubuna göre ($p<0.05$) hem de ZT12 grubuna göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla Bmal1 proteini olduğu gösterildi.

4.8. p53 Protein Seviyesi

30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden Western Blot tekniği kullanılarak fosforlanmış p53 protein seviyesi analiz edildi.

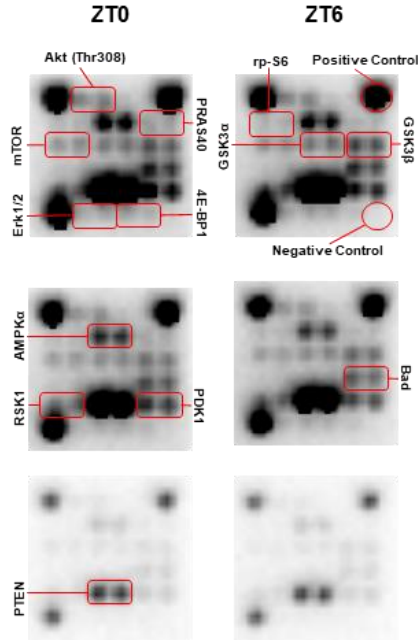


Şekil 4.8.1. p53 protein seviyesinin Western Blot yöntemi ile analizi. Normalizasyon için β-Actin kullanıldı. Veriler ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3 blot/ protein) *p<0.05 ZT0 grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

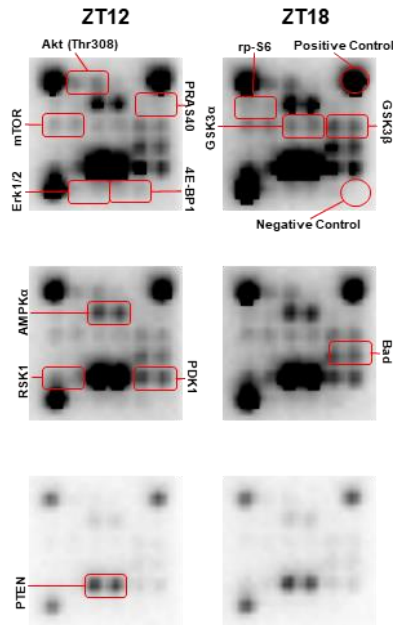
İskemik striatumda ölçülen p53 protein seviyeleri ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre; ZT0 grubu 100.0 ± 6.7 , ZT6 grubu 97.9 ± 7.1 , ZT12 grubu 80.3 ± 14.7 ve ZT18 grubu 76.4 ± 9.3 olarak hesaplandı. Elde edilen bulgulara göre ZT18 grubundaki p53 protein seviyesi ZT0 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterildi.

4.9. Pathscan Analizi

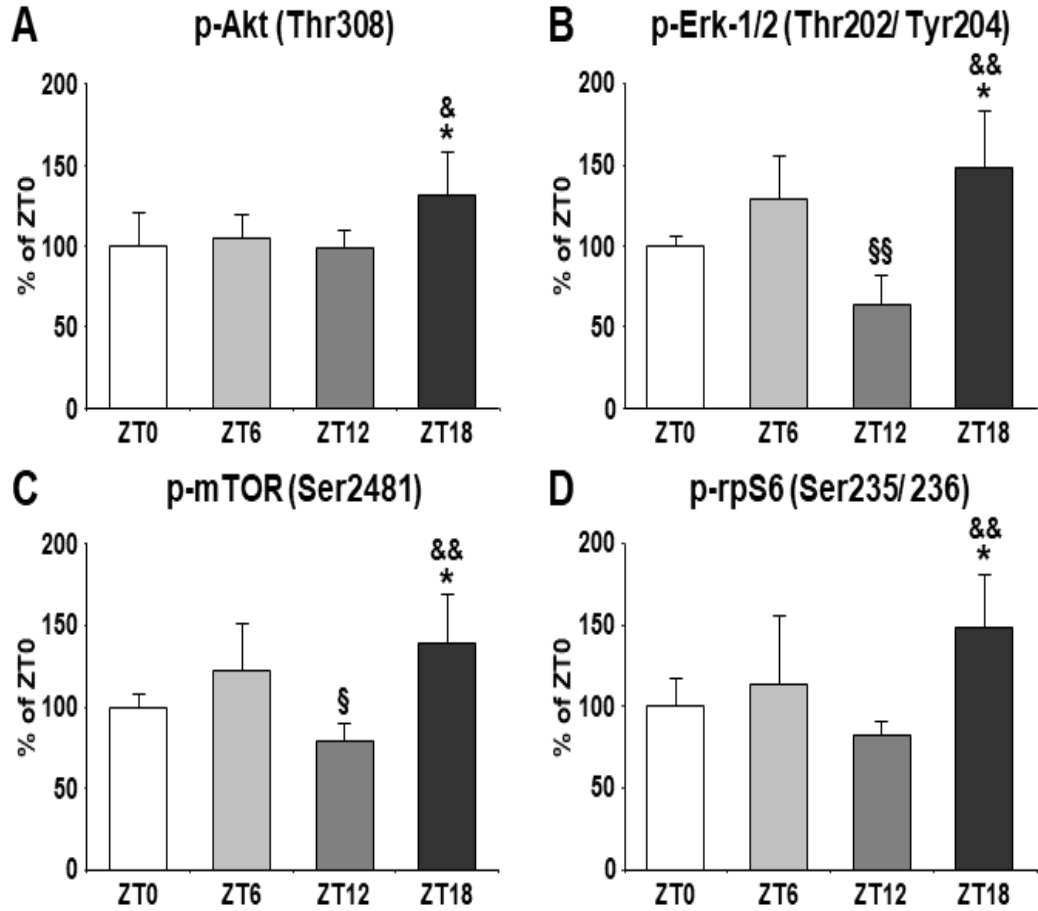
30 dk OSA tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatumdan alınan dokulardan AKT sinyal yolağı analizi yapıldı.



Şekil 4.9.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası ZT0 ve ZT6 grubu Akt sinyal yolağı analizinin görseli.



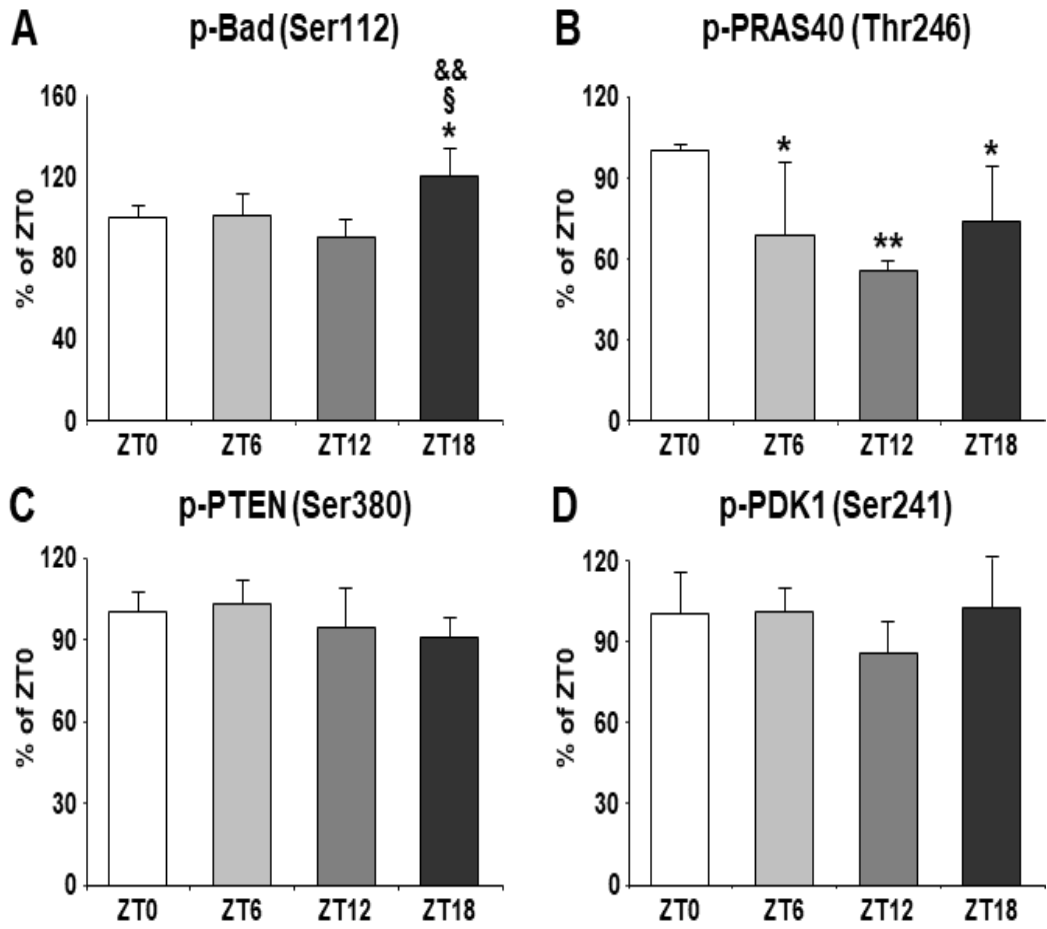
Şekil 4.9.2. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası ZT12 ve ZT18 grubu Akt sinyal yolağı analizinin görseli.



Şekil 4.9.3. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı A) p-Akt (Thr308), B) p-ERK-1/-2 (Thr202/ Tyr204), C) p-mTOR (Ser2481), D) p-rpS6 (Ser235/ 236) analizi Pathscan tekniği kullanılarak yapıldı.. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. (n=7/ grup). * $p < 0.05$ ZT0 grubuna göre, §§ $p < 0.01$ / § $p < 0.05$ ZT12 grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

İskemik striatumdan elde edilen pathscan sonuçları ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplandı. Buna göre p-Akt (Thr308) protein seviyesi; ZT0 grubu 100.0 ± 19.8 , ZT6 grubu 104.8 ± 14.5 , ZT12 grubu 98.9 ± 10.3 ve ZT18 grubu için 131.4 ± 25.8 olarak ölçüldü. p-Akt protein seviyesi ZT18 grubunda ZT0 ($p < 0.05$) ve ZT12 ($p < 0.05$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gösterildi. p-ERK-1/-2 (Thr202/ Tyr204) protein seviyesi: ZT0 grubu 100.0 ± 5.9 , ZT6 grubu 128.1 ± 26.8 , ZT12 grubu 63.0 ± 19.0 ve ZT18 grubu için 147.0 ± 36.4 olarak hesaplandı. p-ERK-1/-2 (Thr202/ Tyr204) protein seviyesi ZT0 ($p < 0.05$) ve ZT12 ($p < 0.01$) grubuna kıyasla ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Ayrıca ZT12 grubunda ise ZT6 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) ölçüde p-ERK-1/-2 (Thr202/ Tyr204) seviyesi azaldığı gösterildi. p-mTOR (Ser2481) protein seviyesi: ZT0 grubunda 100.0 ± 8.3 , ZT6 grubu 122.4 ± 28.8 , ZT12 grubu $78.6 \pm$

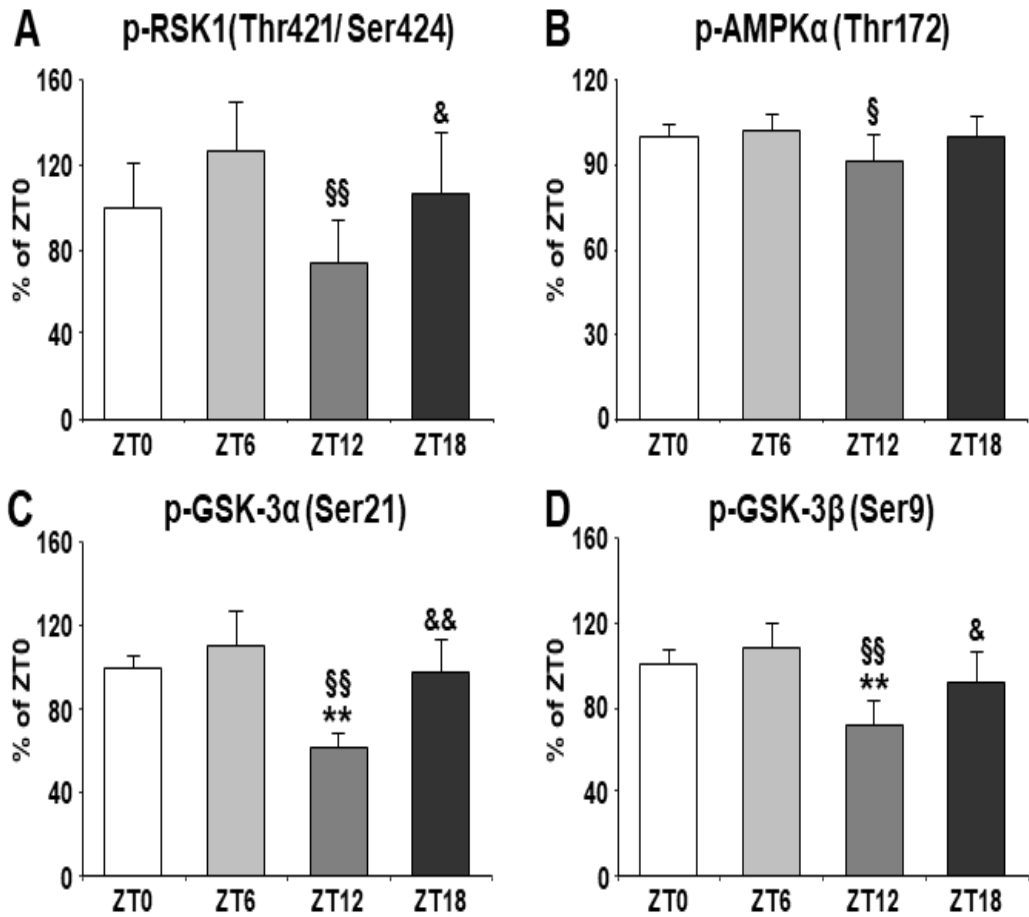
10.9 ve ZT18 grubu için 133.1 ± 37.9 olarak hesaplandı. p-mTOR (Ser2481) protein seviyesi ZT0 ($p < 0.05$) ve ZT12 ($p < 0.01$) grubuna kıyasla ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Ayrıca ZT12 grubunda ise ZT6 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ölçüde p-mTOR (Ser2481) seviyesi azaldığı gösterildi. p-rpS6 (Ser235/ 236) protein seviyesi: ZT0 grubu 100.0 ± 16.2 , ZT6 grubu 113.8 ± 42.2 , ZT12 grubu 82.5 ± 8.1 ve ZT18 grubu 147.7 ± 33.1 olarak hesaplandı. Buna göre p-rpS6 (Ser235/ 236) protein seviyesi ZT0 ($p < 0.05$) ve ZT12 ($p < 0.01$) grubuna kıyasla ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır.



Şekil 4.9.4. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı A) p-Bad (Ser112), B) p-PRAS40 (Thr246), C) p-PTEN (Ser380), D) p-PDK1 (Ser241) analizi Pathscan tekniği kullanılarak yapıldı. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. (n=7/ grup). ** $p < 0.01$ ZT0 grubuna göre, §§ $p < 0.01$ / § $p < 0.05$ ZT12 grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

İskemik striatumdan elde edilen pathscan sonuçları ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplandı. Buna göre p-Bad (Ser112) protein seviyesi; ZT0 100.0 ± 6.5 , ZT6 grubu 101.6 ± 10.3 , ZT12 grubu 90.1 ± 9.2 ve ZT18 grubu için 120.0 ± 13.7 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre p-Bad (Ser112) protein seviyesi ZT18

grubunda ZT0 ($p<0.05$), ZT6 ($p<0.05$) ve ZT12 ($p<0.01$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gösterildi. p-PRAS40 (Thr246) protein seviyesi: ZT0 100.0 ± 2.4 , ZT6 68.6 ± 2.7 , ZT12 55.6 ± 3.9 ve ZT18 73.8 ± 20.2 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre p-PRAS40 (Thr246) protein ifadesi ZT0 grubuna kıyasla ZT6 ($p<0.05$), ZT12 ($p<0.01$) ve ZT18 ($p<0.05$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi. p-PTEN (Ser380) protein seviyesi ZT0 grubunda 100.0 ± 7.6 , ZT6 grubunda 103.4 ± 8.7 , ZT12 grubunda 94.0 ± 15.1 ve ZT18 grubunda ise 90.5 ± 7.5 olarak hesaplandı. Ayrıca p-PDK1 (Ser241) protein seviyesine bakıldığında; ZT0 100.0 ± 15.1 , ZT6 grubunda 101.0 ± 8.3 , ZT12 grubunda 86.0 ± 11.0 ve ZT18 grubunda ise 102.3 ± 18.9 olarak hesaplandı. Hem p-PTEN (Ser380) hem de p-PDK1 (Ser241) protein seviyeleri beyin felci sonrası sirkadiyen ritme bağlı olarak değişmedikleri gözlemlendi.



Şekil 4.9.5. Sirkadiyen ritme bağlı Akt sinyal yolağı A) p-RSK1 (Thr421/ Ser424), B) p-AMPKα (Thr172), C) p-GSK-3α (Ser21), D) p-GSK-3β (Ser9) analizi Pathscan tekniği kullanılarak yapıldı. Veriler \pm standart sapma olarak verilmiştir. ($n=7$ / grup). ** $p<0.01$ ZT0 grubuna göre, §§ $p<0.01$ / \S $p<0.05$ ZT12 grubuna göre, && $p<0.01$ / $\&$ $p<0.05$ ZT12 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

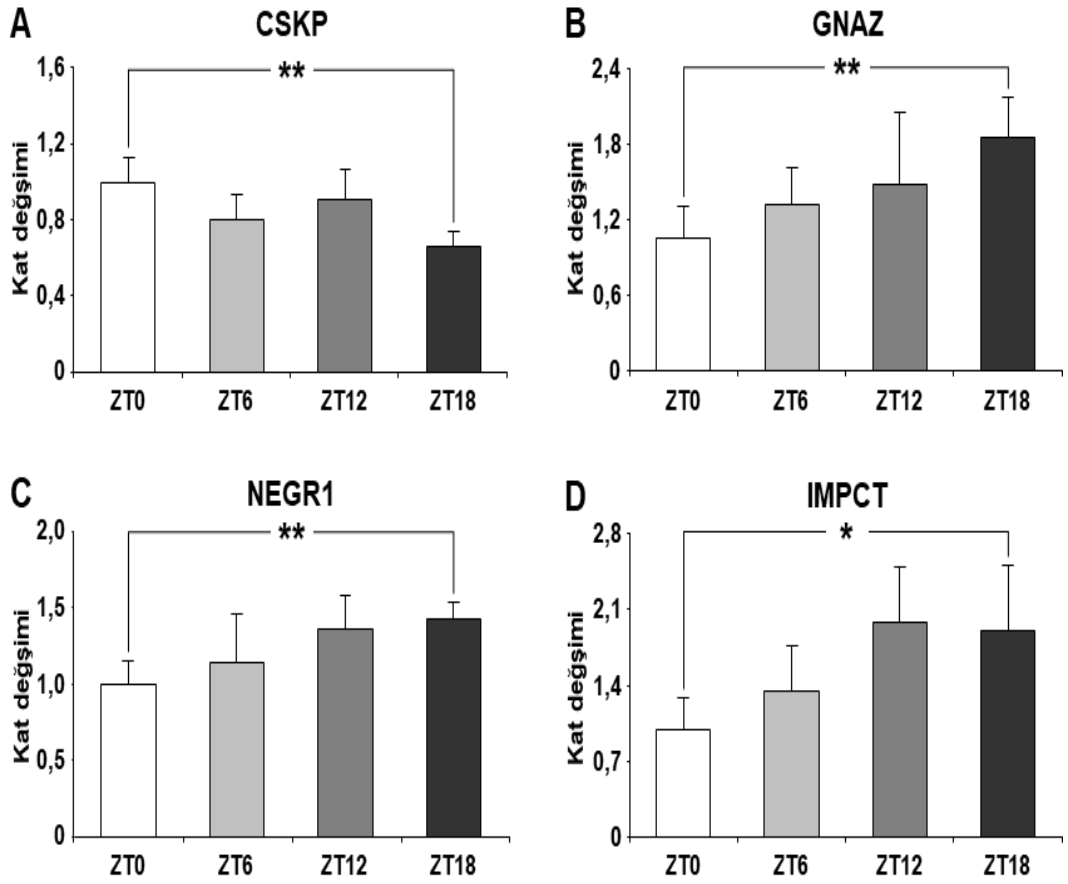
Pathscan sonuçları ZT0 grubuna göre oranlanarak hesaplandı. Buna göre p-RSK1 (Thr421/ Ser424) protein seviyesi; ZT0 grubu 100.0 ± 20.9 , ZT6 grubu 126.3 ± 23.2 , ZT12 grubu 73.9 ± 20.2 ve ZT18 grubu 106.1 ± 28.7 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre p-RSK1 (Thr421/ Ser424) protein seviyesi ZT6 grubuna göre ZT12 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) ölçüde azaldığı, ZT 12 grubuna kıyasla ZT18 grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde arttığı gözlemlendi. p-AMPK α (Thr172) protein seviyesi: ZT0 grubunda 100.0 ± 4.5 , ZT6 grubunda 102.0 ± 5.8 , ZT12 grubunda 91.2 ± 9.4 ve ZT18 grubunda ise 101.1 ± 7.3 olarak ölçüldü. Sonuçlara göre ZT12 grubunda ZT6 grubuna göre p-AMPK α (Thr172) protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma olduğu gözlemlendi. p-GSK-3 α (Ser21) protein seviyesi; ZT0 grubunda 100.0 ± 5.5 , ZT6 grubunda 110.7 ± 16.4 , ZT12 grubunda 61.6 ± 7.1 ve ZT18 grubunda ise 98.1 ± 15.3 olarak hesaplandı. Buna göre ZT12 grubunda ZT0, ZT6 ve ZT18 gruplarına göre p-GSK-3 α (Ser21) protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) bir şekilde azaldığı gözlemlendi. p-GSK-3 β (Ser9) protein seviyesi: ZT0 grubunda 100.0 ± 6.9 , ZT6 grubunda 107.3 ± 12.6 , ZT12 grubunda 71.1 ± 11.9 ve ZT18 grubunda ise 91.3 ± 15.0 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre p-GSK-3 β (Ser9) protein seviyesi ZT 12 grubunda ZT0 ($p < 0.01$), ZT6 ($p < 0.01$) ve ZT18 ($p < 0.05$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu görüldü.

4.10. Proteomiks

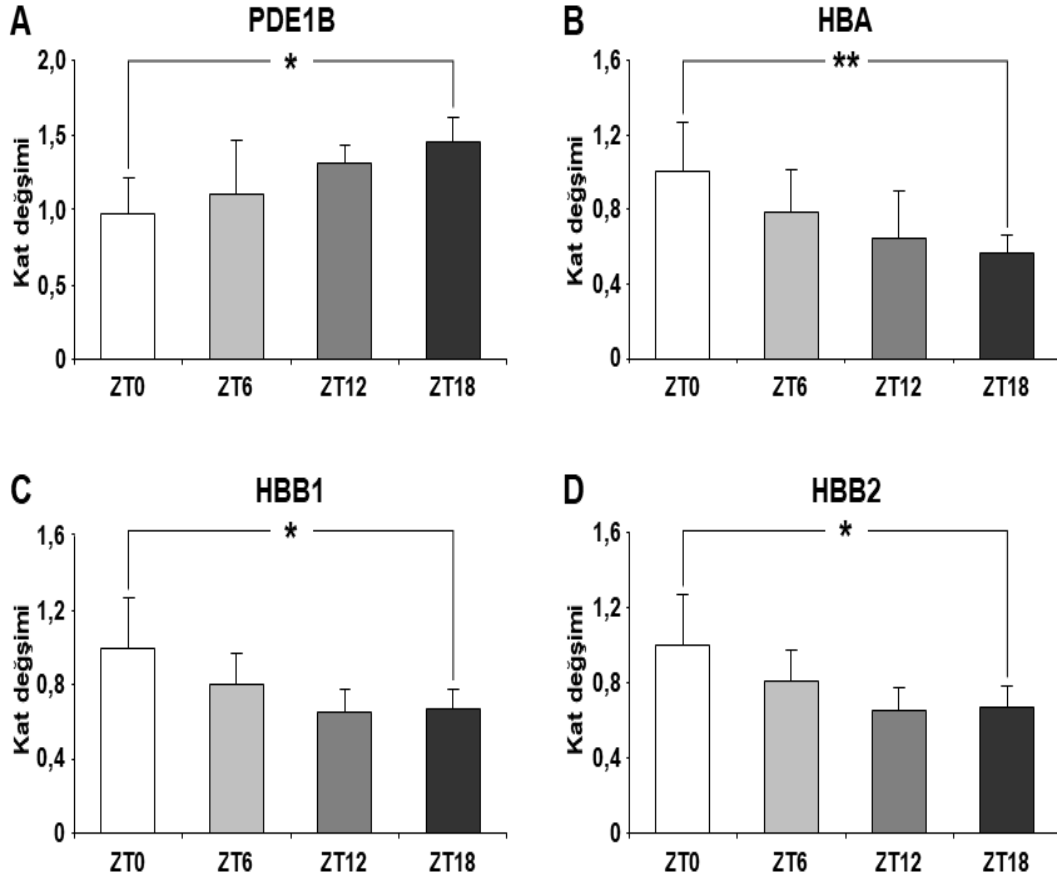
Sirkadiyen ritme bağlı olarak iskemik striatumda değişen protein profili analizi için geniş ölçekli LC-MS/ MS analizi yapıldı.

Sirkadiyen ritme bağlı olarak 30 dk beyin felci takiben 72 saat reperfüzyon sonunda iskemik striatumdan proteomik analizi yapıldı. Elde edilen proteinler ZT0 ve ZT18 arasında 1.4 kat değişen ve ZT0 ve ZT18 arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$ veya $p < 0.05$) ölçüde değişen proteinler seçildi. Buna göre CSKP protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.12 , ZT6 grubunda 0.80 ± 0.07 , ZT12 grubunda 0.90 ± 0.79 ve ZT18 grubunda 0.65 ± 0.04 olarak ölçüldü. GNAZ protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.10 , ZT6 grubunda 1.24 ± 0.13 , ZT12 grubunda 1.39 ± 0.24 ve ZT18 grubunda 1.74 ± 0.13 olarak ölçüldü. NEGR1 protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.08 , ZT6 grubunda 1.14 ± 0.16 , ZT12 grubunda 1.37 ± 0.11 ve

ZT18 grubunda ise 1.42 ± 0.06 olarak hesaplandı. IMPCT protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.14 , ZT6 grubunda 1.35 ± 0.21 , ZT12 grubunda 1.99 ± 0.51 ve ZT18 grubunda 1.92 ± 0.30 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre CSKP protein seviyesi ZT18 grubunda ZT0 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) ölçüde azaldığı görüldü. Ayrıca ZT18 grubu ile ZT0 grubu kıyaslandığında GNAZ ($p < 0.01$), NEGR1 ($p < 0.01$) ve IMPCT ($p < 0.05$) protein seviyeleri ZT18 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.10.1. Sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası değişen A) CSKP, B) GNAZ, C) NEGR1 ve IMPCT protein seviyelerinin LC-MS/ MS analizi. CSKP (gene ID: 12,361; calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase), GNAZ (gene ID: 14,687; guanine nucleotide binding protein z subunit alpha), NEGR1 (gene ID: 320,840; neuronal growth regulator 1), IMPCT (gene ID: 16,210; imprinted and ancient protein). Veriler \pm standart sapma olarak ve ZT0 grubuna göre oranlanarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.10.2. Sirkadiyen ritme bağılı olarak beyin felci sonrası değişen A) PDE1B, B) HBA, C) HBB1 ve HBB2 protein seviyelerinin LC-MS/ MS analizi. A) PDE1B (gene ID:18,574; calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase), B) HBA (gene ID: 15,122; hemoglobin subunit alpha), C) HBB1 (gene ID: 15,129; hemoglobin subunit beta-1), and D) HBB2 (gene ID: 15,130; hemoglobin subunit beta-2). Veriler \pm standart sapma olarak ve ZT0 grubuna göre oranlanarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

PDE1B protein seviyesi; ZT0 grubunda 1.00 ± 0.12 , ZT6 grubunda 1.13 ± 0.18 , ZT12 grubunda 1.35 ± 0.06 ve ZT18 grubunda ise 1.49 ± 0.09 olarak ölçüldü. HBA seviyesi; ZT0 grubunda 1.00 ± 0.13 , ZT6 grubunda 0.78 ± 0.11 , ZT12 grubunda 0.64 ± 0.13 ve ZT18 grubunda 0.56 ± 0.05 olarak hesaplandı. HBB1 protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.13 , ZT6 grubunda 0.81 ± 0.08 , ZT12 grubunda 0.65 ± 0.06 ve ZT18 grubunda ise 0.67 ± 0.06 olarak hesaplandı. HBB2 protein seviyesi: ZT0 grubunda 1.00 ± 0.11 , ZT6 grubunda 0.84 ± 0.09 , ZT12 grubunda 0.64 ± 0.10 ve ZT18 grubunda 0.66 ± 0.06 olarak hesaplandı. PDE1B protein seviyesi ZT18 grubunda ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde arttığı gözlemlendi. Ayrıca ZT 18 grubunda ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak HBA ($p < 0.01$), HBB1 ($p < 0.05$) ve HBB2 ($p < 0.05$) protein seviyelerinde azalma olduğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre beyin felci dünyada ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklar ve kanserden sonra üçüncü sırada yer alan önemli bir hastalıktır. Beyin felcinin bu zamana kadar bilinen tek tedavisi ilk 3 veya 4 saat içerisinde uygulanması gereken tPA'dır. Her üç beyin felci vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken hayatta kalan kişilerde ise oluşan iskemik hasarın büyüklüğüne bağlı olarak yaşamlarının geri kalanında ciddi nörolojik bozukluklarla yüzleşmek zorunda kalmaktadır. Son derece önemli sonuçları olan bu hastalığın tedavisinin kısıtlı olması, bu alanda yapılan ve yapılacak çalışmaların önemini daha da arttırmaktadır. Sirkadiyen ritmin fizyolojik fonksiyonlar üzerine etkilerine oldukça fazla çalışma bulunmasına karşın iskemik beyin felci patofizyolojisinde rol alan moleküler mekanizmalar hakkında veriler sınırlıdır.

Sirkadiyen ritim sadece uyku-uyanıklılık döngüsünü değil aynı zamanda tüm fizyolojik davranışlarımızı etkilemektedir. Sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen vücut sıcaklığı, kalp hızı, kan basıncı, kan viskozitesi ve trombosit agregasyonu beyin felcinin tetiklenmesinde önemli unsurlar olarak rol almaktadır (Kubota ve ark. 1987). Dolayısıyla iskemik inme vakalarının gece saatlerine nazaran sabah saatlerinde yoğunlaştığı göz önünde bulundurulduğunda, iskemik inme toleransının da gece ve gündüz periyotlarına bağlı olarak farklılıklar göstermesi muhtemeldir. Bununla birlikte, hem insanlarda hem de deney hayvanlarında iskemik inme hassasiyetinde zamansal dalgalanmalar hakkındaki veriler oldukça sınırlıdır. Ayrıca beyin felci vakalarının %80'i OSA'in tıkanmasıyla, %20'si ise beyni besleyen damarların yırtılması sonucu ortaya çıkmaktadır (Seki ve ark. 2001). Dolayısıyla insanlarda hemorajik inmelerden ziyade obstruktif nedenlerle meydana gelen inme vakaların daha sık görüldüğü için, bu klinik tabloya farelerde modelleme bakımından OSA tıkanması metodu oldukça önemli bir yere sahiptir (Hermann ve ark. 2001, Kunz ve ark. 2010). Bu sebeplerden dolayı, çalışmamızda farelerde OSA tıkanarak gerçekleştirilen iskemik beyin felci metodu tercih edilmiştir. Nitekim bu metod ile farelerin striatumda, esasen küçük boyutlu nöronların etkilenmesiyle, bölgesel bir nöronal hasar meydana gelmektedir (Hermann ve ark. 2001, Bacigaluppi ve ark. 2009).

Beyin felcinin şiddetine bağlı olarak sirkadiyen ritim proteinlerinin ekspresyonlarının yanı sıra hormonlar ve moleküler sinyal yolları etkilenecek şekilde özellikle uyku-uyanıklılık döngüsünde önemli aksaklıklar meydana gelebilmektedir. Ayrıca uyku süresi ve kalitesi de etkilenebilmektedir (Cavalcanti ve ark. 2013). Uyku bozuklukları ile başta iskemik inme ve alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar arasında doğrudan bir ilişki olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Zunzunegui ve ark. 2011, Mander ve ark. 2015). Meydana gelen uyku bozukluğu sonrası nöroplastisite sürecine etki edebilmekte ve buna bağlı olarak, inme sonrası iyileşmenin verimliliği azalabilmektedir (Zunzunegui ve ark. 2011).

Deneysel beyin felci metodunun başarıya ulaşabilmesi için iskeminin uygulanacağı hemisferde OSA'nın beslediği striatum seviyesindeki toplam beyin kan akımının operasyon öncesine oranla %20-%25'in altına düşmesi gerekmektedir (Rupadevi ve ark. 2011, Shahjouei ve ark. 2016). Bunun için bregma -2 mm posterior; 6mm lateral seviyesi yerleştirilen Laser Doppler'in optik kablosu vasıtasıyla operasyon öncesinde, sonrasında ve reperfüzyon başlangıcında beyin kan akımı gerçek zamanlı olarak kontrol edilmiştir. ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18 gruplarında beyin kan akımı beyin felcinin tetiklenmesi ile beraber %80 oranında azaldığı ve filamentin geri çekilip reperfüzyonun başlatılması ile beraber beyin kan akımının tekrardan arttığı gözlemlenmiştir. Sirkadiyen ritme bağlı olarak iskemik striatumun beslenmesinde gruplar arasında herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Sirkadiyen ritim ve beyin felci arasındaki ilişkiye yönelik veriler daha ziyade gözlem düzeyindeki çalışmalardan elde edilmiş olup, moleküler temelli çalışmalar oldukça sınırlıdır. Nitekim beyin felcinin tetiklenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülen sirkadiyen ritmin beyin felci sonrası gelişen hasar mekanizmaları üzerine bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir Söz konusu çalışmamızda, beyin felcinin tetiklendiği zaman dilimi ve oluşan hasar arasında direkt bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Beyin felci sonrası hücrel sağkalım analizine bakıldığında; gece karanlık saatlerde (ZT18) serebral iskemi geçiren farelerde nöronal hasarın sabah erken saatlerde (ZT0) beyin felci geçiren farelere oranla daha az olduğu belirlenmiştir.

Beyin felci sonrası iskemik alandaki nöronların membran potansiyellerini kaybetmeleri ve eksitotoksositeye bağı olarak uyarılmaları sonucu hücre içine kalsiyum akımı gerçekleşmektedir. Kalsiyum bilindiği üzere yalnızca bir iyon değil aynı zamanda ikincil mesajcı olarak da görev yapmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı çeşitli enzimleri aktive ederek bir yandan hasar alanındaki hücelerin membranlarını hasarlarırken bir yandan da mitakondri bağımlı apopitoz sinyal yolağının aktive olmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda, DNA kırıklarının değerlendirme amacıyla TUNEL boyaması metodu kullanılmıştır. İskemik striatum seviyesinden değerlendirilen apopitotik hücre sayısı analizine bakıldığında ZT0 grubunda ZT18 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla apopitotik hücre olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışma ile sirkadiyen ritme bağı olarak beyin felci sonrası farelerin striatum seviyesindeki sirkadiyen ritim proteinlerinin ekspresyonlarında değişiklik meydana geldiği tespit edilmiştir. Moleküler saat genlerinin ifadeleri, fonksiyonel salınımlar sağılayan pozitif ve negatif geri bildirim döngülerinin etkileşimi vasıtasıyla transkripsiyonel ve translasyonel seviyede düzenlendiği bilinmektedir (Yamamoto ve ark. 2004, Fahrenkrug ve ark. 2006, Fahrenkrug ve ark. 2008). Bu raporlarla uyumlu olarak elde edilen veriler; iskemik fare striatumunda PerII ve Bmal1 proteinlerinin antiphase seviyesinde olduğunu, PerI ve Bmal1 düzeylerinin antiphase olmak yerine çakıştığını düşündürmektedir. Ayrıca, sirkadiyen ritim proteinlerinin ROS üretimini ve oksidatif stres mekanizmalarını kontrol ederek doku homeostazına dahil olduğu da ileri sürülmektedir (Khapre ve ark. 2011). Hem Bmal1 hem de onun dimerizasyon partneri olan Clock, proteini nöronlarda ROS düzeylerinin kontrol altında tutulması bakımından önemli iş birliğine sahiptir (Kondratov ve ark. 2009, Razorenova 2012). İskemik beyinde, ROS seviyeleri yükselir ve bu da hipoksi ile indüklenbilir faktör-1 alfa (HIF-1 α) protein stabilizasyonuna ve aktivasyonuna neden olur (Sharp ve ark. 2001, Kietzmann ve ark. 2001). Bmal1 ve CLOCK proteininin aşırı ekspresyonu ZT18'de doğrudan veya dolaylı olarak HIF-1 α 'nın aktivasyonuna neden olabilir. Buna ek olarak, Akt sinyal yolağının etkinleştirilmesi, ayrıca rapamisin (mTOR) bağımsız yolunun memeli hedefi yoluyla HIF-1 α ekspresyonunu modüle etmesine olanak sağıladığı düşünülmektedir (Pore ve ark. 2006).

Nöronal hasarın sirkadiyen ritimlerin bozulmasına neden olduğu ve saat genlerinin ifade profillerini değiştirdiği iyi bilinmektedir (Meng ve ark. 2008, Boone ve ark. 2012). Yaptığımız bu çalışma ile sirkadiyen ritim proteinlerin ifadelerinin iskemik beyin hasarına tepki olarak değiştiği gösterilmiştir. Dolayısıyla, çalışmamızda nöronal sağkalım ZT18 grubunda ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak daha fazladır. Nöronal sağkalımın artmasına bağlı olarak yapılan pathscan protein görüntülemesi sonucunda sağkalım kinazları olarak bilinen p-AKT ve p-ERK-1/2 protein seviyelerin gece beyin felci geçiren gruplarda daha fazla olduğu gözlemlendi. AKT, mTOR ve rp-S6 sinyal yolları besin akışını, endokrin haberleşmeyi ve hücrel enerjiyi kontrol ederek sirkadiyen ritmi etkilediği bilinmektedir (Zheng ve Sehgal 2010). Ayrıca ZT18 grubunda mTOR ve rp-S6 protein seviyelerinin de ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak artmış olması, beyin hücrelerinin sağkalım gücüne pozitif yönlü bir katkıda buldukları gözlemlenmiştir. Bad proteini normal koşullar altında hücreyi apoptoza götürürken serin 112 noktasından fosforlanması ile tam ters bir etki göstererek sağkalımı arttırdığı bilinmektedir (Kamada ve ark. 2007). Dolayısıyla ZT18 grubunda p-Bad seviyesinin artması ve daha az apoptotik hücre tespit edilmesi bu etkileşimin bir neticesi olarak düşünülmektedir.

Bu analizlerin yanı sıra, beyin felci sonrası sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen protein profilini görmek için geniş ölçekli proteomik analizi de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar; özellikle nöronal sağkalım ve apoptotik hücre ölümünde istatistiksel olarak anlamlılığın görüldüğü ZT0 (gündüz) ve ZT18 (gece) grupları arasında değerlendirildi. Analiz yapılırken ZT0 ve ZT18 arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ve protein ifadesinde en az 1.4 kat fark bulunan proteinler seçildi (Beker ve ark. 2017). Elde edilen proteinler iyon akımlarının düzenleyicileri, nöral gelişim ve nörogenezin yanı sıra mitokondriyal membranına bileşimlerini oluştururlar. Kalsiyum / kalmodulin-bağımlı bir serin protein kinazı olan CSKP protein seviyesi ZT18 grubunda ZT0 grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir ölçüde azalmıştır. Aynı zamanda L tipi kalsiyum akımının regülasyonunda rol aldığı ve P2X3 reseptörleri ile ilişkili ATP olduğu bilinmektedir (Hata ve ark. 1996, Bele ve Fabbretti 2016, Nafzger ve Rougier 2017). GNAZ protein seviyesi ZT18 grubunda önemli derecede artmıştır. GNAZ, nöronal gelişim, aksonal büyüme ve iyon kanalı regülasyonunda önemli bir rolü bulunmaktadır (Hultman ve ark. 2014). Beyinde oldukça bol miktarda bulunan ve nöronal bir

protein olan IMPCT nörit büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Sattlegger ve ark. 2011, Roffe ve ark. 2013). PDE1B'nin diğer beyin bölgelerine kıyasla fare ve insan striatumunda yüksek oranda ve seçici olarak eksprese edildiği ve bunların ekspresyonlarının siklik AMP ve siklik GMP'ye bağlı mekanizmalarla regüle edildiği bilinmektedir (Dlaboga ve ark. 2008). NEGR1 özellikle nöronlarda kolesterol dolaşımında rol oynadığı düşünülmektedir (Kim ve ark. 2017). Hemoglobinin alt birim beta (HBB1, HBB2) ve alfa (HBA) ekspresyonu öncelikle sıçan beynindeki nöronlarda olduğu görüldü ve iskemik hasar üzerine eritrositlerden salınan nöronal hemoglobin ve hemoglobin düzeyleri önemli ölçüde arttığını gösterdi (He ve ark. 2010). Artmış nöronal hemoglobin, travmadan sonra beyin hasarını kötüleştirebilir (Xi ve ark. 2006). Bu raporlarla uyumlu olarak, elde ettiğimiz bulgular; en yüksek nöronal sağkalımın gözlemlendiği zaman diliminde, hemoglobin alt ünitelerinin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Dolayısıyla, bu proteinlerin ekspresyonundaki meydana gelen azalmanın sirkadiyen ritminin düzenlenmesi ve nöronların iskemik hasara karşı korunması bakımından önem arz ettiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Albrecht U. Molecular Mechanisms in Mood Regulation Involving the Circadian Clock. *Frontiers in neurology*. 2017; 8: 30.
- Anea CB, Cheng B, Sharma S, Kumar S, Caldwell RW, Yao L, Ali MI, Merloiu AM, Stepp DW, Black SM, Fulton DJ, Rudic RD. Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. *Circulation research*. 2012; 111: 1157-65.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981; 12: 723-5.
- Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, Kilic E, Kilic U, Salani G, Brambilla E, West MJ, Comi G, Martino G, Hermann DM. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain : a journal of neurology*. 2009; 132: 2239-51.
- 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; 6: 30604-14.
- 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. *Molecular neurobiology*. 2017;
- Bele T, Fabbretti E. The scaffold protein calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase controls ATP release in sensory ganglia upon P2X3 receptor activation and is part of an ATP keeper complex. *Journal of neurochemistry*. 2016; 138: 587-97.
- Berge T, Brynildsen J, Larssen HKN, Onarheim S, Jenssen GR, Ihle-Hansen H, Christophersen IE, Myrstad M, Rosjo H, Smith P, Tveit A. Systematic screening for atrial fibrillation in a 65-year-old population with risk factors for stroke: data from the Akershus Cardiac Examination 1950 study. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2017;
- Boone DR, Sell SL, Micci MA, Crookshanks JM, Parsley M, Uchida T, Prough DS, DeWitt DS, Hellmich HL. Traumatic brain injury-induced dysregulation of the circadian clock. *PLoS one*. 2012; 7: e46204.
- Bouchard-Cannon P, Mendoza-Viveros L, Yuen A, Kaern M, Cheng HY. The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit. *Cell reports*. 2013; 5: 961-73.
- Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004; 24: 133-50.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40: e331-9.
- Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of medical research*. 2006; 37: 11-8.
- Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circulation research*. 2017; 120: 541-558.
- Cavalcanti PR, Campos TF, Araujo JF. Circadian and homeostatic changes of sleep-wake and quality of life in stroke: implications for neurorehabilitation. *NeuroRehabilitation*. 2013; 32: 337-43.
- Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke*. 2014; 45: 1510-8.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999; 22: 391-7.

- Dlaboga D, Hajjhussein H, O'Donnell JM. Chronic haloperidol and clozapine produce different patterns of effects on phosphodiesterase-1B, -4B, and -10A expression in rat striatum. *Neuropharmacology*. 2008; 54: 745-54.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 310-8.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2007; 87: 179-97.
- Elliott WJ. Circadian variation in the timing of stroke onset: a meta-analysis. *Stroke*. 1998; 29: 992-6.
- Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gras S. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 2006; 147: 3769-76.
- Fahrenkrug J, Hannibal J, Georg B. Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *Journal of neuroendocrinology*. 2008; 20: 323-9.
- Gascon S, Sobrado M, Roda JM, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Molecular psychiatry*. 2008; 13: 99-114.
- Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, Esposito E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain research*. 2011; 1372: 92-102.
- Goergen EM, Bagay LA, Rehm K, Benton JL, Beltz BS. Circadian control of neurogenesis. *Journal of neurobiology*. 2002; 53: 90-5.
- Hacariz O, Baykal AT, Akgun M, Kavak P, Sagioglu MS, Sayers GP. Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics*. 2014; 14: 1519-30.
- Hanselman CJ. Timing of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: outcomes-based recommendations for practice. *The Journal of neuroscience nursing : journal of the American Association of Neuroscience Nurses*. 2014; 46: 314-20.
- Hata Y, Butz S, Sudhof TC. CASK: a novel *dlg/PSD95* homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996; 16: 2488-94.
- He Y, Hua Y, Lee JY, Liu W, Keep RF, Wang MM, Xi G. Brain alpha- and beta-globin expression after intracerebral hemorrhage. *Translational stroke research*. 2010; 1: 48-56.
- Hermann DM, Kilic E, Hata R, Hossmann KA, Mies G. Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2001; 104: 947-55.
- Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1996; 8: 195-208.
- Hultman R, Kumari U, Michel N, Casey PJ. Galphaz regulates BDNF-induction of axon growth in cortical neurons. *Molecular and cellular neurosciences*. 2014; 58: 53-61.
- Inagawa T. Seasonal variation in the incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in hospital- and community-based studies. *Journal of neurosurgery*. 2002; 96: 497-509.
- Jiang W, Zhao S, Jiang X, Zhang E, Hu G, Hu B, Zheng P, Xiao J, Lu Z, Lu Y, Ni J, Chen C, Wang X, Yang L, Wan R. The circadian clock gene *Bmal1* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer letters*. 2016; 371: 314-25.
- Kamada H, Nito C, Endo H, Chan PH. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 27: 521-33.

- Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, Kondratov RV. Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo. *Cell cycle*. 2011; 10: 4162-9.
- Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R. Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2001; 251: 170-8.
- Kim H, Chun Y, Che L, Kim J, Lee S, Lee S. The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017; 482: 1367-1374.
- Kinuta Y. [Lipid peroxidation and changes in xanthine oxidase in cerebral ischemia]. *Nihon geka hokan Archiv fur japanische Chirurgie*. 1989; 58: 59-70.
- Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience*. 2009; 158: 1184-93.
- Ko HW, Kim EY, Chiu J, Vanselow JT, Kramer A, Edery I. A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of PERIOD nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3 β /SGG in circadian clocks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010; 30: 12664-75.
- Kondratov RV, Vykhovanets O, Kondratova AA, Antoch MP. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Aging*. 2009; 1: 979-87.
- Kubota K, Sakurai T, Tamura J, Shirakura T. Is the circadian change in hematocrit and blood viscosity a factor triggering cerebral and myocardial infarction? *Stroke*. 1987; 18: 812-3.
- Kunimatsu T, Kobayashi K, Yamashita A, Yamamoto T, Lee MC. Cerebral reactive oxygen species assessed by electron spin resonance spectroscopy in the initial stage of ischemia-reperfusion are not associated with hypothermic neuroprotection. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2011; 18: 545-8.
- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*. 2010; 24: 495-509.
- Lackland DT, Roccella EJ, Deutsch AF, Fornage M, George MG, Howard G, Kissela BM, Kittner SJ, Lichtman JH, Lisabeth LD, Schwamm LH, Smith EE, Towfighi A, American Heart Association Stroke C, Council on C, Stroke N, Council on Quality of C, Outcomes R, Council on Functional G, Translational B. Factors influencing the decline in stroke mortality: a statement from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014; 45: 315-53.
- Liu H, Wei X, Kong L, Liu X, Cheng L, Yan S, Zhang X, Chen L. NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species. *International journal of biological sciences*. 2015; 11: 525-35.
- Loh KP, Huang SH, De Silva R, Tan BK, Zhu YZ. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Current Alzheimer research*. 2006; 3: 327-37.
- Mander BA, Marks SM, Vogel JW, Rao V, Lu B, Saletin JM, Ancoli-Israel S, Jagust WJ, Walker MP. beta-amyloid disrupts human NREM slow waves and related hippocampus-dependent memory consolidation. *Nature neuroscience*. 2015; 18: 1051-7.
- Manev H, Uz T. The role of the light-dark cycle and melatonin in stroke outcome. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 1998; 7: 165-7.
- McBride DW, Tang J, Zhang JH. Development of an Infarct Volume Algorithm to Correct for Brain Swelling After Ischemic Stroke in Rats. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2016; 121: 103-9.
- Meng H, Liu T, Borjigin J, Wang MM. Ischemic stroke destabilizes circadian rhythms. *Journal of circadian rhythms*. 2008; 6: 9.
- Meng X, Wang M, Wang X, Sun G, Ye J, Xu H, Sun X. Suppression of NADPH oxidase- and mitochondrion-derived superoxide by Notoginsenoside R1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through estrogen receptor-dependent activation of Akt/Nrf2 pathways. *Free radical research*. 2014; 48: 823-38.

- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic brain disease*. 2004; 19: 151-67.
- Michaud CM, Murray CJ, Bloom BR. Burden of disease--implications for future research. *Jama*. 2001; 285: 535-9.
- Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Yoshimoto T, Chan PH. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. *Stroke*. 2001; 32: 2356-61.
- Mueller AD, Mear RJ, Mistlberger RE. Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression. *Neuroscience*. 2011; 193: 170-81.
- Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free radical biology & medicine*. 2006; 40: 376-87.
- Nafzger S, Rougier JS. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase CASK modulates the L-type calcium current. *Cell calcium*. 2017; 61: 10-21.
- Pardiwalla FK, Yeolekar ME, Bakshi SK. Circadian rhythm in acute stroke. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 1993; 41: 203-4.
- Paschen W. Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 1996; 56: 313-22.
- Passero S, Reale F, Ciacci G, Zei E. Differing temporal patterns of onset in subgroups of patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2000; 31: 1538-44.
- Paul JR, Johnson RL, Jope RS, Gamble KL. Disruption of circadian rhythmicity and suprachiasmatic action potential frequency in a mouse model with constitutive activation of glycogen synthase kinase 3. *Neuroscience*. 2012; 226: 1-9.
- Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, Kao GD, Maity A. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Molecular cancer research : MCR*. 2006; 4: 471-9.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of neurology*. 1982; 11: 491-8.
- Ratajczak CK, Asada M, Allen GC, McMahon DG, Muglia LM, Smith D, Bhattacharyya S, Muglia LJ. Generation of myometrium-specific Bmal1 knockout mice for parturition analysis. *Reproduction, fertility, and development*. 2012; 24: 759-67.
- Razorenova OV. Brain and muscle ARNT-like protein BMAL1 regulates ROS homeostasis and senescence: a possible link to hypoxia-inducible factor-mediated pathway. *Cell cycle*. 2012; 11: 213-4.
- Robinson I, Reddy AB. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS letters*. 2014; 588: 2477-83.
- Roffe M, Hajj GN, Azevedo HF, Alves VS, Castilho BA. IMPACT is a developmentally regulated protein in neurons that opposes the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase GCN2 in the modulation of neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288: 10860-9.
- Rupadevi M, Parasuraman S, Raveendran R. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011; 2: 36-9.
- Sattlegger E, Barbosa JA, Moraes MC, Martins RM, Hinnebusch AG, Castilho BA. Gcn1 and actin binding to Yih1: implications for activation of the eIF2 kinase GCN2. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286: 10341-55.
- Seki Y, Fujita M, Mizutani N, Kimura M, Suzuki Y. Spontaneous middle cerebral artery occlusion leading to moyamoya phenomenon and aneurysm formation on collateral arteries. *Surgical neurology*. 2001; 55: 58-62; discussion 62.
- Serhatli M, Baysal K, Acilan C, Tuncer E, Bekpinar S, Baykal AT. Proteomic study of the microdissected aortic media in human thoracic aortic aneurysms. *Journal of proteome research*. 2014; 13: 5071-80.

- Shahjouei S, Cai PY, Ansari S, Sharififar S, Azari H, Ganji S, Zand R. Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach. *Journal of vascular and interventional neurology*. 2016; 8: 1-8.
- Sharp FR, Bergeron M, Bernaudin M. Hypoxia-inducible factor in brain. *Advances in experimental medicine and biology*. 2001; 502: 273-91.
- Shohami E, Biegon A. Novel approach to the role of NMDA receptors in traumatic brain injury. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2014; 13: 567-73.
- Sugawara T, Chan PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxidants & redox signaling*. 2003; 5: 597-607.
- Terayama Y. [Circadian rhythm and stroke]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2013; 71: 2130-4.
- Uddin MS, Hoque MI, Uddin MK, Kamol SA, Chowdhury RH. Circadian rhythm of onset of stroke - in 50 cases of ischemic stroke. *Mymensingh medical journal : MMJ*. 2015; 24: 121-6.
- Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-Ozdemir Y, Dalkara T. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke*. 2004; 35: 2189-94.
- Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J. Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neuroscience letters*. 2008; 432: 83-7.
- Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *The Lancet Neurology*. 2006; 5: 53-63.
- Xue T, Song C, Wang Q, Wang Y, Chen G. Investigations of the CLOCK and BMAL1 Proteins Binding to DNA: A Molecular Dynamics Simulation Study. *PloS one*. 2016; 11: e0155105.
- Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamime T, Takumi T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC molecular biology*. 2004; 5: 18.
- Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke*. 1995; 26: 318-22; discussion 322-3.
- Yao H, Takasawa R, Fukuda K, Shiokawa D, Sadanaga-Akiyoshi F, Ibayashi S, Tanuma S, Uchimura H. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain research Molecular brain research*. 2001; 91: 112-8.
- Zechariah A, ElAli A, Doepfner TR, Jin F, Hasan MR, Helfrich I, Mies G, Hermann DM. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke*. 2013; 44: 1690-7.
- Zheng X, Sehgal A. AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker. *Current biology : CB*. 2010; 20: 1203-8.
- Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell death and differentiation*. 2005; 12: 162-76.
- Zhu L, Wang L, Ju F, Khan A, Cheng X, Zhang S. Reversible recovery of neuronal structures depends on the degree of neuronal damage after global cerebral ischemia in mice. *Experimental neurology*. 2017; 289: 1-8.
- Zunzunegui C, Gao B, Cam E, Hodor A, Bassetti CL. Sleep disturbance impairs stroke recovery in the rat. *Sleep*. 2011; 34: 1261-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

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

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2013
Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2012
Lise	Malatya Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu

KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		5.5						

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,85520	68,05958	58,52559
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi
Adobe Photoshop	İyi

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

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Caglayan B, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Beker M, Kelestemur T, Sertel E, Ozturk G, Sahin F, Kilic E, (2017) “Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice” Exp. Neurol. 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.

2. Demirci S, Dogan A, Basak Turkmen N, Telci D, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E, Ozkan F, Dede B, Sahin F, (2017) "Poloxamer P85 increases anticancer activity of Schiff base against prostate cancer in vitro and in vivo" *Anticancer Drugs*. doi: 10.1097/CAD.0000000000000528.
3. **Beker MC**, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, Kelestemur T, Sertel E, Sahin Z, Kutlu S, Kilic U, Baykal AT, Kilic E, (2017) "Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT" *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
4. Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Yulug B, Yilmaz B, Kerman BE, Kilic E, (2017) "Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice" *Redox Biol*. 12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006.
5. Eren Z, Gunal MY, Ari E, Coban J, Cakalagaoglu F, Caglayan B, **Beker MC**, Akdeniz T, Yanikkaya G, Kilic E, Kantarci G, (2016) "Pleiotropic and Renoprotective Effects of Erythropoietin Beta on Experimental Diabetic Nephropathy Model". *Nephron* 132:292-300. doi: 10.1159/000444649.
6. Kartal O, Aydinoz S, Kartal AT, Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Karademir F, Suleymanoglu S, Kul M, Yulug B, Kilic E (2016) "Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3". *Metabolic brain disease*. 31(4):827-35. doi: 10.1007/s11011-016-9816-z.
7. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E (2016) "Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine". *Neuroscience letters* 612:92-97. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.043.
8. **Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E (2015) "Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation". *Oncotarget* 6:30604-30614. doi: 10.18632/oncotarget.5773.
9. Kilic E, Reitmeir R, Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kelestemur T, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM (2014) "HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralateral Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia". *Frontiers in cellular neuroscience* 8:422. doi: 10.3389/fncel.2014.00422.

Uluslararası hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. **Poster- Beker MC**, Caglayan AB, Yalcin E, Kilic U, Baykal AT, Gurel B, Kilic E, "Proteomic Approach To Circadian Rhythm After Brain Injury", 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. **Poster- Caglayan AB, Beker MC**, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Sarma M, Kilic E, "The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling", 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

3. **Poster-** Caglayan B, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Yalcin E, Altunay S, Kelestemur T, Gunal MY, Hanoglu L, Yulug B, Kilic E, “Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neuronal survival in the acute phase and stroke-recovery in the sub-acute phase of focal cerebral ischemia” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
4. **Poster-** Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Elibol B, Beker M, Altug-Tasa B, Ozcicek I, Ozen M, Yilmaz B, Kilic E, “Melatonin Promotes Stroke Recovery By Stimulating Axonal Projections And Neurogenesis”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
5. **Poster-** Yalcin E, Caglayan AB, **Beker MC**, Gurel B, Kelestemur T, Caglayan B, Dalay A, Dilden A, Altunay S, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, “Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
6. **Poster-** Kilic U, **Beker MC**, Caglayan AB, Elibol B, Karakas M, Altug B, Gok O, Kelestemur T, Kilic E, “Melatonin promotes neurological recovery, perilesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
7. **Poster-** Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Altunay S, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E, “Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
8. **Poster-** Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Ozturk G, Kilic E “The role of neuronal expression of P2X7 receptors in the processes of brain injury in mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
9. **Poster-** Kelestemur T, Caglayan AB, **Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Inhibition but not activation of P2X7 receptors improves brain epileptiform activity in mice: Role of iNOS activation” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
10. **Poster-** **Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E, “Roles of oxygen treatment in the development of ischemic brain injury, signal transduction and brain microcirculation after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
11. **Poster-** Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E “The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates melatonin’s neuroprotective activity after focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.
12. **Poster-** Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Kilic E “Roles of P2X7 receptors in neuronal injury after optic nerve transection and focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.

Ulusal hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

1. **Sözlü Sunum-** Keleştemur T, Çağlayan AB, **Beker MC**, Çağlayan B, Yalçın E, Sertel E, Kılıç E, “Beyin Felci Sonrası Gelişen Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopik Teknikleri ile İncelenmesi” 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya, 2017.

2. **Sözlü Sunum- Beker MC**, 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.
3. **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.
4. **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.
5. **Poster- Kilic U, Elibol B, Beker MC**, Caglayan AB, Tasa-Altug B, Beker M, Ozen B, Yilmaz B, Kilic E, “Plasticity-Promoting Effect of Melatonin After Experimental Cerebral Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC112, Düzce/Turkey, 2016.
6. **Poster- 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.
7. **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.
8. **Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
9. **Poster- Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Caglayan B, Kilic E “Melatonin ve normobarik oksijen tedavisinin reperfüzyon hasarına etkileri” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
10. **Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptör baskılanması ve aktivasyonunun beyin epileptiform aktivitesi, mikrodolaşımı ve hücre içi sinyal iletim molekülleri üzerine olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
11. **Poster- Beker MC**, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Normobarik oksijen tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar, sinyal mekanizmaları ve beyin kan dolaşımına olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014
12. **Sözlü sunum- Kilic U, Gok O, Karakas M, Elibol B, Beker MC**, Caglayan AB, Kilic E “İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmeyi sağlayan plastisiteye bağlı moleküler mekanizmalarda melatoninin etkinliğinin araştırılması” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
13. **Sözlü sunum- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC**, Yilmaz B, Kilic E “Sıçanlarda memantin ve melatonin tedavisinin travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin araştırılması” 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2013.
14. **Poster- Caglayan AB, Beker MC**, Kilic E, Kilic U “P2X7 reseptörlerinin fare optik kesisi ve fokal iskemi modelleriyle oluşturulan nöronal hasar üzerine etkisi” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.

15. **Poster-** Kilic U, Caglayan AB, **Beker MC**, Kilic E “Fosfatidil inozitol-3 kinaz/AKT sinyal yolağının Melatoninin iskemi sonrası nöroprotektif etkisinde rolü” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.
16. **Sözlü sunum-** Seker FB, Kilic U, Caglayan AB, Ekimci N, Cevreli B, **Beker MC**, Demirci S, Dogan A, Yilmaz B, Kilic E “Profiklaktik olarak uygulanan 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Redüktaz İnhibitörlerinin penisilinle indüklenen beyin epileptik aktivitesine etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.
17. **Sözlü-sunum-** Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu, Caglayan AB, **Beker MC**, Ekimci N, Kilic E “3-Hydroxy-Methykgkutaryl Coenzyme A reductase inhibitörü rosuvastatinin beyin felci sonrası beyin plastisitesi ve onarım üzerine olan etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.

ÖDÜLLER

1. EMBO Meeting Support, Moleküler Biyoloji Derneği, 2013.
2. 2016 TFBD Genç Araştırmacı Ödülü, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2016.

Etik Kurul Onayı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2016 – 021

Karar Tarihi: 29.04.2016

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümünden Yrd.Doç.Dr.Zafer ŞAHİN ve Mustafa Çağlar BEKER tarafından sunulan **"Sirkadiyen Ritmin Beyin Felci Sonrası Gelişen Hasar Üzerine Etkisi"** başlıklı tez projesi 9 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 4 grupta toplam 28 adet fare kullanılacağı ve farelerin anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yörünlerin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.Selim KUTLU
Başkan

Prof.Dr.Lerna TAYLOR
Üye

Prof.Dr.Ayşe Saide ŞAHİN
Üye

Prof.Dr.Mehmet GÜL
Üye

Doç.Dr.Ercan KÖRER
Üye

Doç.Dr.Tevfik KÜÇÜKKARTALLAR
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hasan Hüseyin KOZAK
Üye-Katılmadı

Yrd.Doç.Dr.Ömer TANYELİ
Üye

Yet.Hek.Halil Aydın ŞİMŞEK
Üye

Yet.Hek.Özgehan ÖZKÜRKÇÜLER
Üye

Mustafa ŞİRİN
Üye-Katılmadı

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akçokuk – Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ad : http://www.konya.edu.tr/merkedar@konudam