



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜLFEM ERBİL**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. METEHAN UZUN**

**ÇANAKKALE – 2022**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLFEM ERBİL

Tez Danışmanı

PROF. DR. METEHAN UZUN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TYL-2021-3406

ÇANAKKALE – 2022



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Gülfem ERBİL tarafından Prof. Dr. Metehan UZUN yönetiminde hazırlanan ve **04/08/2022** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Deneysel Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Piseatannolün Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. Metehan UZUN

.....

(Danışman)

Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU

.....

Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU

.....

Tez No : 10485139

Tez Savunma Tarihi : 04/08/2022

.....  
Doç. Dr. YENER PAZARCIK

Enstitü Müdürü

.././2022

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Gülfem ERBİL

04/08/2022

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez konumun belirlenmesi, tezimin hazırlanması ve yazım süreçlerinde büyük katkıları olan, ihtiyaç duyduğum her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Metehan UZUN'a,

Yüksek lisans öğrenimim süresince beni her konuda dinleyen, yapıcı ve yönlendirici özellikleri ile bana yol gösteren, fizyoloji bilimine olan ilgimi teşvik ederek bu alanda ilerlememi sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU ve Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU'na,

Tezimin deneysel aşamalarında büyük katkılar sunarak bilgi ve tecrübeleriyle bana destek veren değerli hocalarım Doç. Dr. Ümit Ali MALÇOK ve Dr. Öğr. Üyesi Ali AKAR'a

Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen ve Doç. Dr. Başak BÜYÜK, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZTOPUZ ve Dr. Mehmet Akif OVALI'ya,

Eğitimim boyunca ve deneysel çalışmam süresinde desteklerini yanımda hissettiğim ve bu zorlu süreci kolaylaştıran başta değerli arkadaşlarım Ufuk DEMİR ve Berna ÖZBEY olmak üzere Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Lisansüstü öğrencilerine,

Çalışmamın projesini destekleyerek maddi imkan sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ÇOMÜBAP) yönetici ve çalışanlarına,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, varlıklarıyla ve sevgileriyle bana güç veren, düşünceleri ve bakış açılarıyla daima yoluma ışık tutan canım annem, babam ve kardeşime

Teşekkürlerimi sunarım.

Gülfem ERBİL  
Çanakkale, Ağustos 2022

## ÖZET

### **DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gülfem ERBİL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Metehan UZUN

04/08/2022, 119

Subaraknoid kanamalar (SAK) insanlarda yaygın olarak görülmekte ve beyin hasarına bağlı fonksiyon kaybı ve ölümlere yol açmaktadır. SAK'ın altında yatan patofizyolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ve altın standart bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Bu nedenle SAK'a bağlı ölüm oranlarının azaltılmasına, fonksiyon kayıplarının önlenmesine veya SAK sonrası iyileşmeyi hızlandırıcı ajanların geliştirilmesine yönelik deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Piseatannol (PST) son yıllarda anti-inflamatuar ve anti-apoptotik özellikleriyle ön plana çıkan bir moleküldür. Bu çalışmada deneysel SAK modeli oluşturulan sıçanlarda PST'nin tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada toplam 27 adet Wistar Albino ırkı sıçan (200-300 g.; 7-8 haftalık) kullanıldı. Her grupta 9 sıçan olmak üzere SHAM, SAK ve SAK+PST grupları oluşturuldu. SAK modeli oluşturmak için sıçanların kuyruk arterinden 120 ml kan alınarak prekiazmatik sisternaya enjekte edildi. SAK+PST grubunda SAK modeli oluşturulduktan sonra 30 mg/kg dozda PST uygulandı. Tüm gruplardaki 3 sıçan beyin ödemi tespiti amacı ile kullanıldı. Sıçanların çalışma öncesi ve sonrasında Garcia nörolojik skorları belirlendi. Çalışma sonrasında hipokampus dokusu çıkarılarak histopatolojik ve moleküler analizler için kullanıldı.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar PST'nin histopatolojik düzeyde hücresel ödemi ve piknozu azalttığını, nöronal hücrelerin hayatta kalımını arttırdığını ve apoptotik hücre skorunu düşürdüğünü gösterdi. PST uygulamasının hipokampusta TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, p53, kaspaz-3 ve Bax gen ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi.

Sonuç olarak; bulgularımız PST'nin deneysel SAK modelinde, beynin temel moleküler sinyallerini hedeflemesi yoluyla erken beyin hasarı (EBH) tedavisinde terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların azlığı ve mekanizmaların tam anlamıyla aydınlatılamamış olması nedeniyle, PST uygulamasının SAK üzerindeki etkilerini ve altında yatan mekanizmayı ortaya çıkaracak geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız, deneysel SAK'ta PST uygulamasının hipokampus dokusunda inflamasyon ve apoptoz üzerindeki etkilerinin belirlendiği ilk çalışma olup bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalar için katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Subaraknoid kanama, Piseatannol, Apoptoz, İnflamasyon, Hipokampus



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF PICEATANNOL ON EXPERIMENTAL SUBARACHNOID HEMORRHAGE IN RATS

Gülfem ERBİL

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Department of Physiology Master's Thesis

Advisor: Prof. Dr. Metehan UZUN

04/08/2022, 119

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is one of common brain disorders in human which causes brain damage and neurological dysfunction. The underlying pathophysiological mechanisms of SAH have not yet been fully elucidated and a gold standart treatment method is lacking. For this reason, experimental and clinical studies are required in order to prevent loss of neurological function, reduce SAH related mortality rates and develop new agents for accelerate recovery after SAH. Piceatannol (PST) is one of promising molecules in recent years providing a wide variety of preventive and therapeutic options with its antiinflammatory and antiapoptotic properties. In this study it was aimed to investigate the therapeutic effects of PST with experimental SAH model in rats.

Twenty seven Wistar Albino rats (200-300 g; 7-8 weeks old) were used in this study. Three groups were formed with 9 rats in each group; SHAM, SAH and SAH+PST respectively. SAH model was induced with 120 µl autologous arterial tail blood through injection into the prechiasmatic cisterna. After one hour of SAH induction, PST was administrated at a dose of 30 mg/kg intraperitoneally in SAH+PST group. Garcia neurological scores of rats were determined beginning and at the end of the study. Total brain samples from three rats were used for estimation of cerebral edema. Hippocampus samples were harvested for histopathological and molecular analysis.

The outcomes of this study showed that PST reduced cellular edema and pycnosis at histopathological levels, increased the survival of neuronal cells and decreased the apoptotic cell scores. It was determined that PST treatment significantly reduced TNF- $\alpha$ , IL-6, NF-Kb, p53, caspase-3 and Bax gene expression levels in hippocampus.

Consequently, our findings suggest that PST may have potential therapeutic effects in EBI after SAH. However, due to the scarcity of studies on this subject and the fact that the mechanisms have not been fully elucidated, extensive studies are required to reveal the effects of PST application on SAH and the underlying mechanism. Our research is the first study investigated that the effects of PST treatment on inflammation and apoptosis in the hippocampus in experimental SAH model.

**Keywords:** Subarachnoid hemorrhage, Piceatannol, Apoptosis, Inflammation, Hippocampus

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

1

1.1. Subaraknoid Kanama.....	4
1.1.1. Subaraknoid Kanamanın Tarihçesi.....	4
1.1.2. Subaraknoid Kanamanın Epidemiyolojisi.....	5
1.1.3. Subaraknoid Kanamanın Risk Faktörleri.....	5
Değiştirilemez Risk Faktörleri.....	6
Değiştirilebilir Risk Faktörleri.....	6
Diğer Risk Faktörleri.....	7
1.1.4. Subaraknoid Kanamanın Etiyolojisi.....	7
1.1.5. Subaraknoid Kanama ve Anevrizma.....	8
1.1.6. Subaraknoid Kanamanın Prognuzu.....	10
1.2. Deneysel Subaraknoid Kanama Modelleri.....	11
1.2.1. Deneysel Subaraknoid Kanama Modellerinde Nörolojik Testler.....	13
1.2.2. Deneysel Subaraknoid Kanama Modellerinde Beyin Ödeminin Tespiti...	13
1.2.3. Deneysel Subaraknoid Kanama Modellerinde Histopatolojik	14
Değerlendirmeler.....	14
Subaraknoid Kanamada Genel Histopatolojik Değerlendirme.....	15

Subaraknoid Kanamada Nissl Cisimciklerinin Değerlendirilmesi.....	16
Subaraknoid Kanamada TUNEL Boyama.....	17
1.3. Subaraknoid Kanama Sonrası İnflamatuvar Cevap.....	17
1.3.1. TNF- $\alpha$ .....	18
1.3.2. IL-6.....	19
1.3.3. IL-1 $\beta$ .....	20
1.3.4. NF- $\kappa$ B.....	21
1.3.5. TLR4.....	22
1.3.6. p53.....	24
1.4. Apoptoz.....	25
1.4.1. Kaspazlar ve Kaspaz-3.....	27
1.4.2. Bcl-2 Ailesi Proteinleri.....	29
1.4.3. Bcl-2 ile İlişkili X Proteini (Bax).....	30
1.4.4. SIRT1.....	31
1.5. Piseatannol.....	33

## İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Subaraknoid Kanama ve Piseatannol.....	36
---------------------------------------------	----

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

3.1. Hayvan Materyali.....	38
3.1.1. Grupların Oluşturulması.....	38
3.2. Deney Planı.....	39
3.3. Anestezi İşlemi.....	41
3.4. Piseatannol Çözeltilsinin Hazırlanması ve Uygulanması.....	41
3.5. Taşıyıcı Hazırlanması ve Uygulanması.....	41
3.6. Yöntem.....	41
3.6.1 Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması.....	42
3.6.2. Nörodavranışsal Değerlendirme.....	45
3.6.3. Ötenazi ve Örneklerin Alınması.....	45
3.7. Beyin Ödemi Tespiti.....	45

3.8.	Histopatolojik Analizler.....	46
3.8.1.	Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü.....	46
3.8.2.	Kristal Viyole Boyama Prosedürü.....	47
3.8.3.	TUNEL Boyama Prosedürü.....	47
3.9.	Genetik Analizler.....	48
3.9.1.	Total RNA İzolasyonu.....	48
3.9.2.	cDNA Eldesi.....	48
3.9.3.	Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması.....	49
3.10.	İstatiksel Analizler.....	50

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.	Mortalite ve Subaraknoid Kanama Operasyonu Bulguları.....	51
4.2.	Beyin Ödemi Tespit Bulguları.....	52
4.3.	Nörodavranışsal Değerlendirme Bulguları.....	53
4.4.	Histopatolojik Bulgular.....	54
4.4.1.	Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları.....	54
4.4.2.	Kristal Viyole Boyama Bulguları.....	58
4.4.3.	TUNEL Boyama Bulguları.....	60
4.5.	Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	63
4.5.1.	TNF- $\alpha$ Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	63
4.5.2.	IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	64
4.5.3.	IL-1 $\beta$ Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	64
4.5.4.	NF- $\kappa$ B Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	65
4.5.5.	TLR4 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	66
4.5.6.	p53 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	67
4.5.7.	Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	68
4.5.8.	Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	69
4.5.9.	Bax Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	70
4.5.10.	SIRT1 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler .....	71

BEŞİNCİ BÖLÜM  
TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

73

5.1. Tartışma.....	73
5.2. Sonuç ve Öneriler.....	86
KAYNAKÇA .....	88
EKLER .....	I
EK 1. ETİK KURUL ONAY FORMU .....	I



## SİMGELER VE KISALTMALAR

SAK	Subaraknoid kanama
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör-alfa
IL-1 $\alpha$	İnterlökin-1 alfa
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
ROS	Reaktif oksijen türleri
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
OH <sup>-</sup>	Hidroksiradikal
O <sup>-</sup>	Superoksit
SIRT1	Sirtüin 1
p53	Tümör protein 53
EBH	Erken beyin hasarı
PST	Piseatannol
RES	Resveratrol
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
Bax	Bcl-2 ilişkili protein
IKB	İntrakraniyel basınç
SKA	Serebral kan akımı
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP nick uç etiketleme
H-E	Hematoksilen-Eozin
AVM	Arteriovenöz malformasyon
KBB	Kan-beyin bariyeri
TTP	Tristetraprolin
MSS	Merkezi sinir sistemi
NLRP3	NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3
LPS	Lipopolisakkarit
HMGB1	Yüksek mobiliteli grup kutusu 1
ACEA	Kannabinoid tip 1 reseptör agonisti

PT	Pterostilben
HIF-1 $\alpha$	Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa
PAMP'ler	Patojenle ilişkili moleküler modeller
MyD88	Miyeloid farklılaşma faktörü 88
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ASC	CARD içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein
ENT1	Dengeleyici nükleosit taşıyıcı
2-PMAP	2-[(Pridin-3-İl-Metilen)Amino]fenol





## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Hayvanların gruplandırılması ve yapılan uygulamalar	39
<b>Tablo 2</b>	H-E boyama verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan skorlama kriterleri	46
<b>Tablo 3</b>	cDNA sentez protokolü	49
<b>Tablo 4</b>	PCR koşulları	49
<b>Tablo 5</b>	Real Time PCR bileşen miktarları	50

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim No</b>	<b>Resim Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 1a</b>	Subaraknoid kanama modeli basamaklarını gösteren resimler	43
<b>Resim 1b</b>	Subaraknoid kanama modeli basamaklarını gösteren resimler	44
<b>Resim 2</b>	Tüm gruplardan 24. saatte beynin ventralinden elde edilen örnek birer görüntü	52
<b>Resim 3</b>	Hipokampus dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsüne ait bir örnek	54



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Bir arterin duvar yapısının şematik olarak gösterimi	9
Şekil 2	Willis poligonunun şematik olarak gösterimi	10
Şekil 3	MiR-195-5p'nin, NF-κB sinyal yoluyla SAK sonrası etkilerinin şematik gösterimi	22
Şekil 4	TLR4/MyD88/NF-κB sinyal yolu aracılığıyla fluoksetinin anti-inflamatuar etkilerinin potansiyel moleküler mekanizmalarının şematik gösterimi	24
Şekil 5	Apoptoz yolları	27
Şekil 6	Subaraknoid kanamayı takiben nöronal apoptoza giden yolun şematik gösterimi	28
Şekil 7	Subaraknoid kanamadan sonra apoptotik basamaklar.	31
Şekil 8	Subaraknoid kanamayı takiben erken beyin hasarında SIRT1'in rolünün şematik gösterimi.	33
Şekil 9	Üç stilbenin kimyasal yapıları: resveratrol, piceatannol, pterostilben	34
Şekil 10	Deney planının şematik gösterimi.	40
Şekil 11	Tüm gruplara ait beyin ıslak/kuru oranı verilerinin yüzde olarak gösterimi	53
Şekil 12	Çalışma gruplarının nörolojik skor bulgularının karşılaştırılması	54
Şekil 13	SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x)	55
Şekil 14	SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x).	56
Şekil 15	SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x)	56
Şekil 16	Çalışma gruplarından elde edilen H-E boyalı histolojik kesitlerde hücrel ödeme kriterine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	57
Şekil 17	Çalışma gruplarından elde edilen H-E boyalı histolojik kesitlerde hücrel piknoz kriterine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	57

<b>Şekil 18</b>	SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).	58
<b>Şekil 19</b>	SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).	59
<b>Şekil 20</b>	SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).	59
<b>Şekil 21</b>	Çalışma gruplarına ait Kristal Viyole boyalı histolojik kesitlerden elde edilen değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	60
<b>Şekil 22</b>	SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x).	61
<b>Şekil 23</b>	SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x).	61
<b>Şekil 24</b>	SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x).	62
<b>Şekil 25</b>	Deney gruplarında TUNEL <sup>+</sup> hücre sayılarının karşılaştırılması	62
<b>Şekil 26</b>	TNF- $\alpha$ gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	63
<b>Şekil 27</b>	IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	64
<b>Şekil 28</b>	IL-1 $\beta$ gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	65
<b>Şekil 29</b>	NF- $\kappa$ B gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	66
<b>Şekil 30</b>	TLR4 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	67
<b>Şekil 31</b>	p53 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	68
<b>Şekil 32</b>	Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	69
<b>Şekil 33</b>	Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	70
<b>Şekil 34</b>	Bax gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	71
<b>Şekil 35</b>	SIRT1 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	72

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), beyni besleyen arterlerin yırtılması sonucu subaraknoid bölgeye kan sızmasıdır. Travma dışında en sık karşılaşılan damarsal patolojilerdendir (Jabbarli vd., 2018; Li vd., 2011; Marbacher vd., 2018; Wang vd., 2019a; Wu vd., 2011a). Coğrafik bölgelere göre değişmekle birlikte görülme sıklığı 11-16/100.000'dir. En sık görüldüğü yaş aralığı 40-60'dır. SAK'ta mortalite ve morbiditeyi belirleyici faktörler; ilk 24 saatte gelişen ağır nörolojik gerileme, ileri yaş, anevrizma boyutlarının büyük olması, beyin ödeminin hızlı gelişmesi ve beyin dokusu içine sızan kanama miktarıdır (Cakir vd., 2019; Park vd., 2004). SAK'ta ölüm oranları % 50'ye ulaşabilmektedir (Long vd., 2017). Ölen hastaların % 12'si hastaneye yetişmeden, % 33'ü ilk 48 saatte, % 50'si ise ilk 30 günde kaybedilmektedir. Yeniden kanama oluşma riski ise ilk 24 saatte % 4'tür. Hayatta kalanlar ise ciddi fonksiyon kayıpları dahil birçok kısıtlılık ile hayatlarına devam etmektedirler.

Oldukça karmaşık bir patogeneze sahip olan SAK sonrasında kanayan bölgeye lenfosit, monosit, lökosit, granülosit ve makrofaj göçü başlar. Bu hücrelerle birlikte eritrositler de inflamatuvar reaksiyonların yanında farklı zincirleme reaksiyonları tetiklerler. Kanama sahasına göç eden hücrelerden salınan tümör nekroz faktör (TNF)- $\alpha$ , interlökin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler inflamasyonun akut evresini başlatırlar. İnaktif durumda olan nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) farklı reaksiyonlarla üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksiradikal (OH<sup>-</sup>) ve superoksit (O<sup>-</sup>) gibi serbest radikaller tarafından uyarılır (Hou vd., 2018). Bu sitokinlerden trimetrik 17 kDA polipeptit yapıda olan TNF- $\alpha$ , monosit ve makrofajlarca üretilen ve beyin dokusundaki hücreler için sitotoksik etkili inflamatuvar bir ajandır. Aktive TNF- $\alpha$ , inaktif halde mitokondrilerde bulunan kaspazları aktive ederek apoptozu başlatır (Benveniste vd., 2014; Hou vd., 2018). Bu olaylar sırasında beyin hücrelerindeki ATP'nin azalmasına bağlı olarak hücre zarındaki Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz, Ca<sup>++</sup>-ATPaz ve H<sup>+</sup>-ATPaz transport pompaları etkin çalışamaz. Kalsiyumun hücre içine girişi artar ve glutamat gibi eksitatör amino asitler sinaptik aralıkta birikir. Hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasıyla birlikte lipaz, fosfolipaz,

proteaz, endonükleaz gibi yıkıcı enzim düzeyleri de yükselir. Bu olaylar dizisi apoptozun uyarılmasına yol açan başka bir faktördür (Hou vd., 2018).

Sirtuin 1 (SIRT1) önemli bir deasetilazdır ve p53 (tümör protein 53) asetilasyonunun düzenlenmesi yoluyla hücre döngüsünün sonlanmasında, apoptozda ve tümör baskılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Kim vd., 2012; Skyes vd, 2006; Tang vd., 2006). Çok sayıda çalışma SIRT1'in oksidatif stres, bağışıklık tepkisi, mitokondriyal biyogenez ve apoptoz/otofaji gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları modüle edebileceğini ortaya koymuştur (Donmez, 2012). Önceki çalışmalar, SIRT1'in iskemik modellerde beyni ve kalbi koruyabileceğini göstermektedir (Becatti vd., 2012; Yan vd., 2013). Serebral iske mi, travmatik beyin hasarı, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında SIRT1, metabolizma, stres direnci ve genomik stabilitedeki işlevleri nedeniyle koruyucu etkiler göstermiştir (Herskovits ve Guarente, 2014). Bununla birlikte, şimdiye kadar, SIRT1'in SAK kaynaklı erken beyin hasarı (EBH) üzerindeki hücre sel ekspresyonu ve nöroprotektif etkileri belirsizliğini korumaktadır ve bu anlamda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda, SAK sonrası gelişen ikincil komplikasyonlar ve kötü sonuç arasındaki ilişki oldukça dikkat çekmiştir. Bu duruma EBH olarak adlandırılan patofizyolojik mekanizmaların yol açtığı düşünülmektedir. Bu nedenle klinik ve hayvan araştırmaları EBH'ye yol açan fizyopatolojik mekanizmalara odaklanmıştır (Rass ve Helbok, 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar SAK sonrası 24. ve 72. saatler içerisinde gelişen morbidite ve mortalitenin vazospazmdan daha çok EBH'den kaynaklandığını ileri sürmektedir. EBH'nin altında yatan mekanizmanın akut hasar basamakları olduğu düşünülmektedir. Hücre sel apoptoz dahil pek çok moleküler mekanizmanın ise bu süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (Yuksel vd., 2012). Bütün bu nedenlerle SAK'ta erken dönemde EBH'nin etkin tedavisi oldukça önemlidir.

Yukarıda verilen bilgilerin yanı sıra SAK'ın patogene zinde vazospazm başta olmak üzere başka patolojik mekanizmalar da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte hala bilinmeyen birçok nokta da bulunmaktadır. Yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı üzere

SAK'ta ölüm oranları oldukça yüksektir. Sağ kalanların bir kısmı ise bazı işlev kayıpları ile hayatlarına devam edebilmektedir. SAK için geliştirilmiş ve kesin tedavi sağlayan altın standart bir yöntem mevcut değildir. Bu durum bilinen klasik tedavi yöntemlerinin yanında yeni ve tamamlayıcı yöntemler konusunda yoğun araştırmaların yapılmasına ve yeni moleküllerin keşfedilerek etkilerinin incelenmesine yol açmaktadır.

Piceatannol (PST) bu aday moleküllerden bir tanesi olup, resveratrol (RES)'ün yapısal ilişkili bir analogudur. PST yaban mersini, üzüm ve çarkıfelek meyvesi tohumlarında yaygın olarak bulunan anti-inflamatuar, anti-oksidatif, anti-proliferatif aktivitelere sahip bir moleküldür (Kalariya vd., 2013). Bu etkileri nedeni ile karaciğer hasarı (Wen vd., 2018), kalp krizi (Wang vd., 2019b), kanser (Lucas vd., 2018) ve cilt hastalıklarının (Maruki-Uchida vd., 2018) tedavisinde kullanılmıştır.

PST'nin SAK tedavisindeki rolü konusunda bilgiler ise oldukça sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızda, SAK modeli oluşturulan sıçanlarda ilk 24 saatte ortaya çıkan EBH'ye karşı PST'nin olası koruyucu etkilerinin ve altta yatan mekanizmaların araştırılması hedeflenmiştir. PST'nin inflamatuvar süreç üzerine olası etkileri TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B ve toll benzeri reseptör 4 (TLR4) gen ekspresyonları düzeylerinin belirlenmesi ile incelenmiştir. Ayrıca apoptozun belirlenmesi amacı ile kaspaz-3, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 ilişkili protein (Bax) ve SIRT1 gen ekspresyonları belirlenmiş ve hipokampus dokusunda terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP nick uç etiketleme (TUNEL) boyaması yapılmıştır. Bütün bunlara ek olarak Nissl boyaması ile histopatolojik düzeyde nöronal hücre hasarı, Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yapılarak ise ödem ve piknoz skorları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar PST'nin deneysel SAK modelinde beyin hasarı üzerine koruyucu etkileri ve moleküler mekanizmalar konusunda bilgi sağlayacak niteliktedir. Ayrıca PST'nin SAK'ın tedavisinde yardımcı bir ajan olarak kullanılabilme potansiyeli için bir gösterge özelliği taşımaktadır.

## **1.1. Subaraknoid Kanama (SAK)**

SAK çeşitli faktörlerin neden olduğu kafa içi damar yırtılması sonrası kanın kafa içi veya spinal kanal subaraknoid boşluklarına girmesiyle oluşan sendromu ifade eder (Li vd., 2017). SAK, yüksek oranda mortalite ve morbidite ile ilişkili ölümcül bir serebrovasküler hastalıktır (Zhang vd., 2019a). Sağlık alanında hızla artan gelişmelere rağmen, SAK'nın morbidite ve mortalite düzeylerinde çok büyük bir ilerleme kaydedilmemiştir. Bu nedenle SAK'ın sağlık sistemi üzerindeki ekonomik ağırlığında azalma olmamıştır. SAK'ta hem hasta hem de hastaya bakım veren aile üyeleri için hayat kalitesi ve ekonomik kayıp oldukça fazladır (Üçler vd., 2017).

### **1.1.1. Subaraknoid Kanamanın Tarihçesi**

Subaraknoid kanamanın klinik tablosu ilk olarak Hipokrat tarafından belirtilmiş olsa da serebral anevrizmaların varlığı ve yırtılarak SAK'a sebep olabilecekleri 18. yüzyıla kadar bilinmemiştir. İlk olarak, 18. yüzyılda serebral anevrizmalar ve bunların rüptürünün SAK'a yol açtığı Morgagni ve Biumi tarafından bildirilmiştir (Vallée, 1998).

Egas Moniz'in 1927 yılında gerçekleştirdiği serebral anjiyografi uygulaması sayesinde SAK etiyojisi hakkındaki bilgilerin arttığı bilinmektedir (Sypert vd., 1975). Walker Dandy ise 1938 yılında anevrizma boynunu klipsleyen ilk kişi olarak tarihe geçmiştir (Dandy, 1938).

Yaşargil 1960-1970 yılları arasında SAK'ta mikrocerrahi tekniğini ilk kez uygulamış ve anterior sirkülasyona ait anevrizma cerrahisinin bugünkü ilerleyişine büyük katkı sağlamıştır. Drake ise posterior sirkülasyon anevrizmalarının cerrahisinde önemli katkılar sunmuştur. Görüntüleme ve tanı yöntemlerindeki gelişmenin, özellikle bilgisayarlı tomografi (BT)'nin sıklıkla tercih edilmesi ve subtraksiyon-magnifikasyon gibi ileri anjiyografi teknikleri ile tanı konulamayan SAK olguları üzerindeki bilgi ve yetkinlikler artmıştır (Erdoğan, 2015; Yadigaroglu, 2018).



### **1.1.2. Subaraknoid Kanamanın Epidemiyolojisi**

SAK'lı olgularda en çok rastlanan sebep intrakranial anevrizmalar olup toplumun % 2'sinde görülür (Wilkins, 1981). Rüptüre bir intrakraniyal anevrizmadan kaynaklanan SAK, tüm felçlerin % 5 gibi oldukça önemli bir kısmını oluşturur. SAK'lı hastaların yarısı 55 yaşından küçüktür, üçte biri kanamadan sonraki ilk günler ile haftalar içinde ölür ve hayatta kalanların çoğunda uzun süreli sakatlık veya bilişsel bozukluk ortaya çıkar (Etminan vd., 2019).

Anevrizma rüptürüne sonucu oluşmayan SAK olgularında prognoz iyidir. Bu olgularda kanamanın tekrarlanma sıklığı daha azdır ve ilerleyen zamanlarda serebral iskemik görülmesi ise oldukça azdır. Bu şekilde meydana gelen SAK'ta iskemik inme, vazospazm ya da kanamanın tekrarlanmasını engellemek amacı ile yoğun bir tedaviye ihtiyaç yoktur (Adams ve Gordon, 1991; Rinkel vd., 1991).

Morbidite ve mortalitede çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bunları kanamanın şiddeti, serebral vazospazm, kanamanın tekrarı ve cerrahi komplikasyonlar şeklinde sıralamak mümkündür (Kassel vd., 1990). SAK sonrası hastalarda başvuru zamanları ve kanama sırasındaki bilinç düzeyleri hastalığın prognozunda önem taşır (Bolander vd., 1984).

### **1.1.3. Risk Faktörleri**

SAK oluşumunda çeşitli risk faktörleri mevcuttur. Bu faktörler değiştirilemez, değiştirilebilir ve diğer risk faktörleri olmak üzere üç grupta incelenmektedir.

## **Değiştirilemez Risk Faktörleri**

SAK'a neden olduğu öngörülen değiştirilemez risk faktörlerinin başında yaş gelmektedir. Elli yaş ve üzerinde kanama insidansı yüksektir (de Rooij vd., 2007). Yaşla değişmekle birlikte kanama oranı ayrıca cinsiyete göre de değişkenlik gösterir ve kadınlarda daha yüksektir (Kaptain vd., 2000). SAK, etnik kökenlere göre de değişiklik gösterir. Beyaz Amerikalılar ile Afroamerikalılar kıyaslandığında Beyaz Amerikalılarda görülme oranı daha fazladır. Ayrıca Finlandiya ve Japonya'da SAK insidansının daha fazla olduğu bildirilmiştir (de Rooij vd., 2007; Linn vd., 1996; Poisson vd., 2014; Suzuki vd., 2015).

Soygeçmişinde anevrizma sebebiyle SAK görülen hastalarda; bu hastalığın riski diğer kişilere göre 4 kat daha fazladır (Kaptain vd., 2000). Önceden SAK geçirmiş hastalarda SAK tekrarlama oranı ise; anevrizması olup öyküsünde SAK bulunmayan hastalara göre daha yüksektir (Ishibashi vd., 2009). Ailesel bir risk faktörü olarak SAK geçiren hastaların % 7-20'sinin aile yakınlarında intraserebral anevrizma öyküsü bulunmaktadır (Kaptain vd., 2000).

## **Değiştirilebilir Risk Faktörleri**

Sigara, hipertansiyon, alkol, oral kontraseptifler, post menopozal hormon replasman tedavisi ve kokain kullanımı gibi faktörler SAK için değiştirilebilir risk faktörleri başlığı altında incelenebilir (Hicks vd., 2019; Johnston vd., 1998). Değiştirilebilir risk faktörlerinin başında sigara kullanımı gelir (Feigin vd., 2005; Juvela vd., 1993). Risk oranı, içilen miktar ile artar ve bırakıldığında risk de azalır (Bonita, 1986). Sigara kullanımı aynı zamanda SAK'ın daha erken yaşlarda görülmesine de sebep olmaktadır (Weir vd., 1998). Hipertansiyonun anevrizmal SAK için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bununla beraber hipertansiyon, SAK geçiren ve cerrahi tedavi uygulanan hastalarda ikincil kanama için de bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Feigin vd., 2005; Öhman, 1990).

Anevrizma rüptür riskinin yoğun alkol tüketimi ile birlikte erkeklerde 4.5 kat arttığı bildirilmiştir. Bu oran kadınlarda 6.4 katına kadar çıkmaktadır (Feigin vd., 2005).

### **Diğer Risk Faktörleri**

Değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörlerinin dışında kalan bazı kalıtsal hastalıklar (Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı, Ehlers-Danlos sendromu tip I ve IV, Marfan sendromu, Nörofibromatozis tip I, osteogenezis imperfekta, psödoksantoma elastikum, alfa-antitripsin eksikliği) diğer risk faktörleri arasında sayılabilir (Pfohman ve Criddle, 2001; Yan vd 2015).

Diğer risk faktörleri arasında stres öyküsü, anevrizmaların yerleşim yeri (erkeklerde anterior komünikan arter, kadınlarda internal karotid arterde daha sık görülmesi), anevrizma boyutu (7 mm'den büyüklerde artan risk), sistemik enfeksiyon, fazla kahve tüketimi ve gün içerisindeki ani sıcaklık değişiklikleri gibi faktörler de bulunur (Ishibashi vd., 2009, Söderholm vd., 2014).

#### **1.1.4. Subaraknoid Kanamanın Etiyolojisi**

Travmatik ve nontravmatik olmak üzere SAK iki sınıfta incelenir. SAK'ın en sık görülen nedeni travmalardır. İntrakranial anevrizma rüptürü ise % 80 oran ile travma dışı SAK'ın en sık görülen sebebidir ve spontan SAK olarak da bilinir. Arteriovenöz malformasyon (AVM), anevrizma rüptüründen sonra kanamaya en çok neden olan durum olup kanamaların % 4-5'ine yol açmaktadır. SAK gelişen hastaların % 15'inde ise yapılan incelemelerde bir sebep saptanamamıştır ve bu grup spontan SAK olarak ifade edilmektedir (Zacharia vd., 2010).

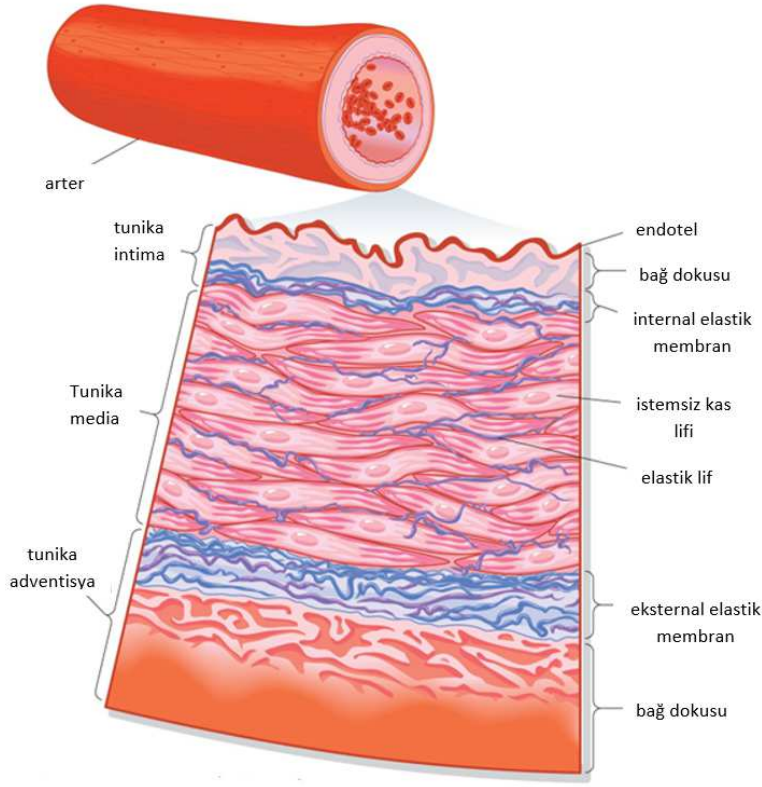
### 1.1.5. Subaraknoid Kanama ve Anevrizma

SAK olgularında en sık görülen neden intrakranial sakküler anevrizmaların rüptürü olduğundan bu kısımda intrakranial anevrizmalar ayrıca ele alınmıştır.

Anevrizma, damarın genişlemesi anlamındadır. Anevrizma üç şekilde karşımıza çıkabilir:

1. Arterin bir yerinden dışarıya doğru tomurcuklanması (sakküler)
2. Arterin balonlaşıp genişlemesi (fusiform)
3. Arter duvarının içerisine doğru dissekan olması (Zubkov vd., 1999).

Arter duvarında bir bölgenin zayıflaması ve bazı dinamik güçlerin bu zayıf noktayı iterek büyümeye yol açması anevrizmanın oluşmasına sebep olur. Kan basıncının ve türbülansının artışı, arterin media tabakasındaki zayıf bölgede ve damarın internal elastik laminasında bir dejenerasyon başlatır. Damarın intima tabakasında ise duvarından içeriye doğru herniasyon gelişir ve lezyon gitgide büyür. Lezyonun genişlemesi, damar içi basınç ve rejenerasyonu takiben anevrizma duvarında kalın ve ince bölgeler gelişir. Kan basıncının artmasıyla ya da seneler süren intravasküler basıncın devamlı etkisi ile anevrizma duvarındaki bu ince alanlar yırtılarak kanamaya yol açar (Suzuki vd., 1978).



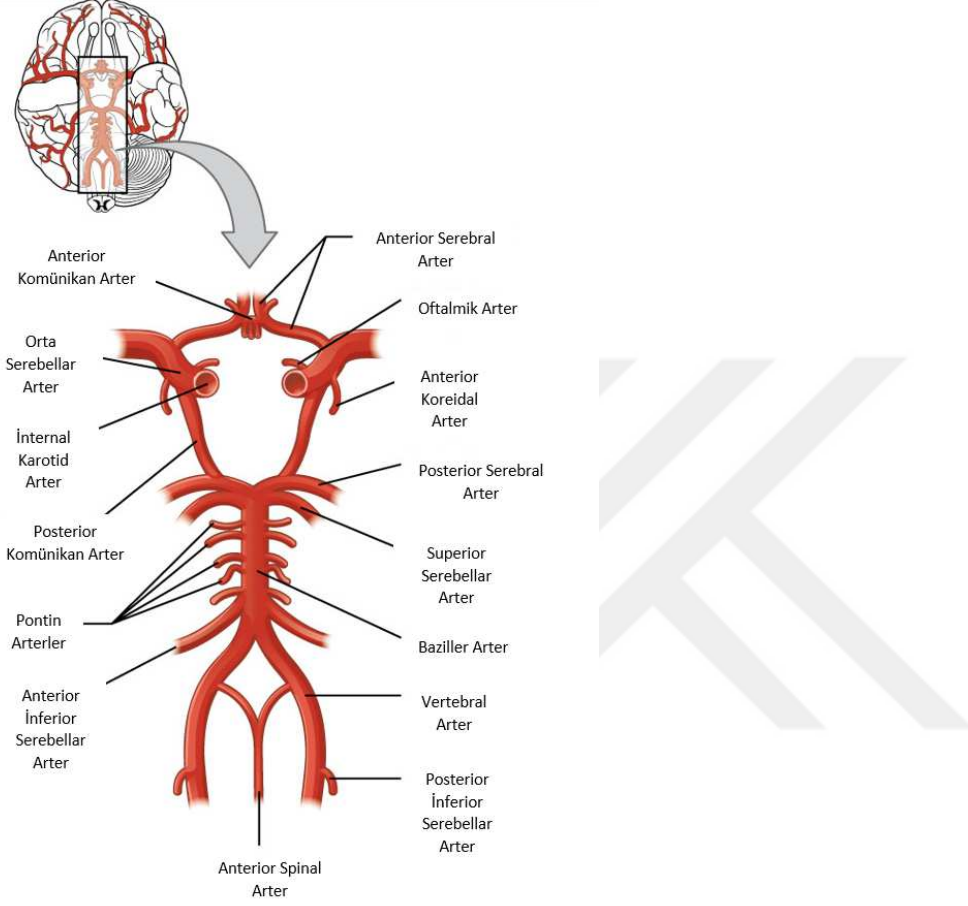
Şekil 1. Bir arterin duvar yapısının şematik olarak gösterimi.

Media katmanındaki hasar genellikle büyük serebral arterlerin bifürkasyon bölgelerinde veya yan dal verdiği alanlarda olduğundan anevrizmalar çoğunlukla bu bölgelerde görülür (Kumral, 1975). Konjenital ve sonradan oluşan dejeneratif farklılaşmalar sakküler anevrizmaların biçimlenmesinde birlikte rol oynamaktadırlar. Bu nedenle sakküler anevrizmalar konjenital anevrizmalar olarak da tanımlanabilir. İkiz olgularında aynı bölgelerde anevrizmalara rastlanması anevrizma oluşumunda herediter etkenlerin de varlığını desteklemiştir (Mohr vd., 2005). Diğer taraftan intrakranial anevrizmalar sıklıkla polikistik böbrek, AVM, Ehler-Danlos sendromu, Moyamoya hastalığı, fibromusküler displazi ve aort koarktasyonu gibi farklı konjenital malformasyonlarla da birlikte bulunabilirler (Schievink vd., 1991).

Beyin arterlerinin diğer arterlerden ayıran özellikler şunlardır;

- İnternal elastik tabakalarının daha zayıf olması,
- Eksternal elastik katmanlarının mevcut olmaması,

- Elastik lifleri bulunmayan zayıf adventisya katmanları içermesi,
- Media katmanlarının kalın olmaması.



Şekil 2: Willis poligonunun şematik olarak gösterimi.

### 1.1.6. Subaraknoid Kanamanın Prognozu

SAK oldukça kötü prognoza sahip bir hastalıktır. SAK sonrası tanı ve tedavideki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda mortalite oranları düşse de morbiditede artış izlenmektedir (Lovelock vd., 2010). Anevrizmal SAK hastalarının % 10-15'i sağlık kurumuna erişmeden hayatını kaybetmektedir (Lovelock vd., 2010). Tanıdaki pek çok gelişmeye rağmen sağlık kurumuna erişebilen hastalarda mortalite ve morbidite % 50'yi bulmaktadır. SAK olgularında erken dönemdeki mortaliteye vazospazm, yeniden kanama, ve geç serebral iskemi, intrakranyal basınç artışı, hidrosefali, nöbetler, kardiyak

komplifikasyonlar gibi SAK sonrası sık görülen komplifikasyonlar sebep olur. SAK'tan sonra hayatta kalan hastalarda uzun periyotlarda nörobilişsel fonksiyonlarda ve hafızada gerileme, epilepsi ve başka fokal nörolojik aksaklıklar görülebilmektedir (Scott vd., 2010; Wong vd., 2012). Ayrıca hayat kalitesini etkileyen ve tedavi ihtiyacı doğuran depresyon, anksiyete ve uyku bozukluklarına sık rastlanır (Hackett vd., 2000; Visser-Meily vd., 2009).

## 1.2. Deneysel Subaraknoid Kanama Modelleri

İnsanlarda araştırma olanakları sınırlı olduğundan, SAK patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması için deneysel modellemelerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. İdeal SAK modeli klinik SAK'ı taklit etmeli, çok tekrarlanabilir olmalı, şiddette değişikliklere ve yeterli kontrollere izin vermeli ve ayrıca geniş deney hayvanı serilerinde uygulaması kolay olmalıdır. SAK'ı incelemek için birçok hayvan türü kullanılmıştır, ancak sıçanlar, düşük maliyeti ve biyolojisi hakkında sahip olduğumuz önemli bilgiler nedeniyle giderek popüler hale gelmiştir (Prunell vd., 2002). Günümüzde sıçanlarda yaygın olarak iki temel işlemi esas alan SAK modeli uygulanır. Bunlar;

1. Kafa içi bir damarın delinmesi ile oluşturulan modeller (Bederson vd., 1995; Veelken vd., 1995).
2. Beyin sarnıçlarına kan enjekte edilerek gerçekleştirilen modellerdir (Delgado vd., 1985; Zhao vd., 1999).

Günümüzde her iki model türü de sıklıkla kullanılmaktadır. Her iki modelin de çeşitli avantajları ve dezavantajları vardır.

Kafa içi delinme modeli bir intrakraniyal arterin endovasküler delinmesiyle gerçekleştirilir ve SAK patofizyolojisine en yakın model gibi görünmektedir. Bu modelin en önemli avantajı sıçanlarda kafa kemiğine perforasyon oluşturmadan kanamanın şekillendirilmesidir. Ayrıca insanlarda SAK, kafa içi damarların rüptürü ile ortaya çıktığından model insanlardaki SAK'ı taklit edebilmektedir. Ancak bu modelde kanamanın şiddetini ayarlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Kanamanın şiddeti açısından grup

içi veya gruplar arası farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle verilecek kan miktarının bilinmesi gereken çalışmalarda beyin içine otolog arteriyel kan enjeksiyonu yöntemi daha çok tercih edilmektedir. Bütün bu bilgiler göz önüne alındığında, kanamanın şiddetinin kontrol edilememesi (Schwartz vd., 2000), yüksek mortalite (Bederson vd., 1995) ve yeterli bir plasebo prosedürünün olmaması, endovasküler perforasyon yönteminin araştırma amaçlı kullanımını sınırlandırmaktadır.

Kan enjeksiyonu modelleri iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlardan ilki, sıçanlarda en sık kullanılan SAK modelidir ve sisterna magna yoluyla subaraknoid boşluğa kan enjeksiyonu ile gerçekleştirilir. Bu modelin uygulanması ve tekrarlanması kolaydır, ancak çeşitli dezavantajları mevcuttur. SAK'ın olağan klinik tablosundan farklı olarak kan, daha çok posterior kraniyal fossa ve spinal kanala dağılır. Ayrıca, intrakraniyel basınçtaki akut artış, anevrizmal SAK sırasında olduğu gibi ortalama arter basıncı seviyelerine ulaşmaz. Bu nedenlerle ikinci bir kan enjeksiyon modeli geliştirilmiştir (Prunell vd., 2002).

Geliştirilen bu yeni SAK modelinde, kan, prekiazmatik sisternaya enjekte edilir. Bu durum kanın bazal subaraknoid boşluk boyunca ve küçük bir ölçüde hemisferler üzerinde birikmesiyle sonuçlanır (Delgado vd., 1985; Solomon vd., 1985). Bu yöntemin en önemli özelliği klinik SAK'a olan benzerliğidir. İlk olarak, kanın dağılımı, vakaların % 90'ından fazlasında ön dolaşımdaki bir anevrizma rüptüründen kaynaklanan klinik SAK'ı simüle eder (Kassell vd., 1990; Velthuis vd., 1998). İkincisi, intrakraniyel basınçta ortalama arter basıncı seviyelerine ani bir artış da anevrizmal SAK'ı taklit eder. Üçüncüsü, kan infüzyonu sırasında ortalama arter basıncına eşlik eden bir artış meydana gelir (Prunell vd., 2002). Bütün bu nedenlerle prekiazmatik sisternaya kan enjeksiyon modeli günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır ve çalışmamızda da bu model tercih edilmiştir.



### **1.2.1. Deneysel Subaraknoid Kanama Modellerinde Nörolojik Testler**

SAK modeli uygulanan sıçanlarda, SAK ve EBH'nin diğer etkilerinin tespiti için birçok nörolojik test yapılmaktadır. Tüm bu testler ile genel olarak motor ve bilişsel işlevler ve bu işlevlerdeki bozulmaların belirlenmesi amaçlanır. Bu testler arasında rotarod testi (Sherchan vd., 2011), Morris su labirenti (Jeon vd., 2010), açık alan testi (Turan vd., 2017) ve Garcia skorlaması en sık tercih edilenleridir. Hem nörolojik hem de davranışsal bir değerlendirme imkanı sunması açısından Garcia skorlaması nörolojik testler arasında öne çıkmaktadır (Gu vd., 2015; Shi vd., 2017; Wang vd., 2022; Xiao vd., 2022; Zhang vd., 2019b). Bu nedenle çalışmamızda, SAK'ta nörodavranışsal fonksiyonların değerlendirilmesinde Garcia skorlaması tercih edilmiştir.

Garcia skorlaması; her gruptaki sıçanların nörolojik fonksiyonlarını ölçmek için maksimum 18 puana sahip, spontan aktivite (0-3 puan), dört uzuv hareketinde simetri (0-3 puan), ön pençeyi uzatma (0-3 puan), tırmanma (1-3 puan), vücut hissi (1-3 puan) ve dokunma (1-3 puan) parametrelerini içeren altı testten oluşur. Yapılan değerlendirmede daha düşük bir puan, nörolojik disfonksiyonun daha şiddetli olduğunu gösterir (Garcia vd., 1995).

### **1.2.2. Deneysel Subaraknoid Kanama Modellerinde Beyin Ödemini Tespiti**

SAK'ı takiben EBH, işlev bozuklukları ile ilişkilidir ve hasta mortalitesine yol açar. EBH'nin karakteristik özellikleri arasında beyin ödemi, nöronal inflamasyon, nöronların apoptozu ve iskemi bulunur (Bederson vd., 2009; Broderick vd., 1994). Beyin ödemi esas olarak kan-beyin bariyeri (KBB)'nin bozulmasından kaynaklanır ve SAK sonrası hastaların yüksek ölüm oranından sorumlu olan ana faktördür (Claassen vd., 2002). KBB'nin bozulmasından sonra beyinde aşırı su birikmesi vazojenik ödeme yol açar (Unterberg vd., 2004). KBB bozukluğunun kemoterapötik ajanlarla tedavisi, SAK hastalarının prognozunu iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır (Suzuki vd., 2010).

İnsanlarda SAK patogenezindekine benzer şekilde deneysel SAK modellerinde de beyin ödemi şekillenmektedir. Sıçanlarda SAK sonrası beyin ödemi moleküler ve histopatolojik yöntemlerin yanı sıra yaş beyin/kuru beyin oranı belirlenerek ölçülür. Bu amaçla ıslak ve kuru ağırlık oranı (%) olarak aşağıdaki formül ile hesaplanır (Ding vd., 2015).

$$\text{Beyin Sıvı İçeriği} = [(\text{Islak Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Islak Ağırlık}] \times \%100$$

SAK'ta beyin ödemi ve buna bağlı nöron hasarı oranının yüksek olması hemen hemen tüm deneysel SAK modellerinde beyin ödeminin incelenmesine yol açmıştır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada SAK sonrası beyin ödeminin ortaya çıktığı ve melatonin uygulamasının SAK grubuna kıyasla beyin ödeminin anlamlı oranda azalttığı görülmüştür (Ersahin vd., 2009). Cheng vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada endovasküler perforasyon yöntemi ile SAK oluşturulan grupta SHAM grubundaki sıçanlara oranla ödem miktarında artış gözlenmiştir (Cheng vd., 2020). Xu vd.'nin oluşturdukları SAK modelinde ise erken beyin hasarında SAK grubunda SHAM grubuna göre ödem miktarı artmıştır (Xu vd., 2021a).

SAK sonrası EBH, SAK hastalarının kötü sonuçlarında önemli bir faktör gibi görünmektedir, çünkü hücre (nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) ölümü genellikle SAK'tan sonraki 24-72 saat içerisinde meydana gelir ve SAK, KBB geçirgenliğinde ve ödemde ilerleyici bir artışa yol açar (Friedrich vd., 2010). Bu nedenle SAK sonrası yardımcı ajan olarak kullanılabilir moleküller hakkında yoğun çalışmalar yapılmaktadır. SAK sonrası RES'in teröpatik etkilerinin incelendiği bir çalışmada araştırmacılar RES'in mortaliteyi, kanama miktarını ve beyin ödeminin azalttığını ve SAK sonrası nöral fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığını bulmuşlardır (Guo vd., 2018).

### **1.2.3. SAK Modellerinde Histopatolojik Değerlendirmeler**

SAK'ta histopatolojik değerlendirmeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden bazıları aşağıda belirtilmiştir;

- a) Elde edilen beyin dokusunda ödem, hücreyel infiltrasyon, vasospazm ve hücrelerin genel durumunu değerlendirmek için uygulanan H-E boyaması (Guo vd., 2018).
- b) Hasarlı hücreleri göstermek üzere uygulanan Kristal Viyole boyaması,
- c) Apoptotik hücre sayısını göstermek için uygulanan TUNEL boyama yöntemi.

### **Subaraknoid Kanamada Genel Histopatolojik Değerlendirme**

Histopatolojik değerlendirmeler SAK'ın patogenezi anlamada oldukça yardımcı tekniklerdir. Bu değerlendirmeler nörolojik skorlama ve beyin ödemi tespitinin yanında moleküler, genetik ve biyokimyasal analizler ile birlikte değerlendirildiğinde uygulanan modelin oluşup oluşmadığı ve tedavi edici ajanın etkinliği konusunda fikir verici nitelik taşımaktadır.

Gecikmiş tipteki nöronal değişiklikler (piknoz/eozinofili ve hematoksinofili kaybı), geri dönüşü olmayan hücre hasarının güvenilir göstergeleridir. Ultrastrüktürel düzeyde bu gecikmiş değişiklikler, plazma ve nükleer membranlardaki kırılmaları ve mitokondriyal iç matrister elektron yoğun çökeltilerin birikmesini içerir (Farber vd., 1981; Trump vd., 1984).

H-E boyama ile saptanan nöronal piknoz, son zamanlarda iskemik beyin hasarından sonra nöronal dejenerasyon için de bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Zou vd., 2018). Min vd. tarafından geçici serebral iskemi modeli oluşturulan sıçanlarda nöronal dejenerasyonu değerlendirmek için, H-E boyama ile nöronal piknoz incelenmiş ve apoptoz genlerinin mRNA ekspresyonu analiz edilmiştir. Hipokampal nöronların H-E boyaması, zengin sitoplazmalı normal hücreleri ve nispeten büyük ve net nükleol oluşumu ile yuvarlak ve hafif lekeli çekirdeği ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık, dejenere olmuş nöronlar atrofik sitoplazma ve küçülmüş cisimler sergilemiştir. Dejenere olmuş nöronların çoğu, yoğun ve derin boyanmış bir çekirdekle küçülmüş ve bazıları, nöronal piknoz olarak tanımlanan küçük hücreli soma ile düzensiz morfoloji göstermiştir (Min vd., 2020).

Guo vd. tarafından SAK modeli oluşturulan başka bir çalışmada SAK grubu sıçanların beyinleri, makroskopik gözlem altında, SHAM grubu sıçanların beyinleriyle karşılaştırıldığında, Willis halkasının yakınında değişen derecelerde ödem ve bariz kan pıhtıları görülmüştür. H-E boyaması, SAK'dan 24 saat sonra kortekste nöronal piknoz, şişme, burulma, hücre gövdesi deformasyonu ve hücre dışı boşluk genişlemesi göstermiştir (Guo vd., 2018).

### **Subaraknoid Kanamada Nissl Cisimciklerinin Değerlendirilmesi**

Kristal Viyole boyama, kristal viole boyasının kullanıldığı bir Nissl boyama metodudur. Bu boya, Nissl boyamada kullanılan diğer boyalar gibi DNA ve RNA'lara tutunur. Bu şekilde sitoplazmada bulunan yüksek oranda RNA içeren kaba endoplazmik retikulum ve ribozomların (Nissl cisimciklerinin) de boyanması sağlanır.

Nöronlar protein sentezi açısından aktif olan hücrelerdir ve sitoplazmalarında gelişmiş kaba endoplazmik retikulumları mevcuttur. Bu nedenle Nissl boyama ile beyindeki diğer hücrelerin perikaryasını tanımadan nöronların sitoplazması spesifik olarak boyanabilir. Bu şekilde, astrositleri de etiketleyen nötr kırmızı boyama gibi diğer karşı boyama yöntemlerine kıyasla Nissl boyama sadece nöronları boyayan bir metot olarak kullanılmaktadır (Kádár vd., 2009; Gurina ve Simms, 2020).

Bütün bu nedenlerle kristal viyole boyama subaraknoid kanama çalışmalarında sinir hücrelerindeki hasarı belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ostrowski vd., 2005; Sun vd., 2019; Wan vd., 2021).

## **Subaraknoid Kanamada TUNEL Boyama**

Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP Nick-End Labeling boyama, 1992 yılında tanımlanan ve literatürde TUNEL olarak adlandırılan bir değerlendirme metodudur. TUNEL metodu in situ olarak DNA fragmantasyonlarının lokalizasyonlarını belirlemekte ve apoptozun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem, TdT tarafından çift sarmallı DNA kırılmalarının kör uçlarının şablondan bağımsız tanımlanmasına dayanır. TdT ve sıklıkla biyotinli dUTP işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme yapılmaktadır. Bu işaretlemelemlerle apoptotik hücreler kahverengi nükleuslu, sağlam hücreler ise mavi nükleuslu olarak görüntülenmektedir. Görüntülemelerde her kesitten 5 farklı alanda 500 hücre sayılarak apoptotik indeks oluşturulmaktadır (Güleş ve Eren 2008; Kyrylkova vd., 2012; Öztopuz vd., 2020).

Sıçanlar üzerine yapılan bir SAK çalışmasında sisterna magnaya uygulanan kan enjeksiyonundan 24 saat sonra DNA fragmantasyonları belirlenmiştir (Matz vd., 1996). Prekiazmatik sisternaya kan enjeksiyonu yapılan başka bir çalışmada ise SAK'ta apoptozun önemi ortaya koyulurken apoptozun gösterilmesinde kullanılan yöntemlerden biri de TUNEL metodu olmuştur (Prunell vd., 2005a). SAK modelinin yapıldığı başka bir çalışmada da TUNEL metodu nöronal apoptozu göstermenin esas yolu olarak tercih edilmiştir (Xiao vd. 2022). Bütün bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere TUNEL boyama SAK'ta apoptoz değerlendirmesinde kullanılabilecek temel yöntemlerden biridir.

### **1.3. Subaraknoid Kanama Sonrası İnflamatuvar Cevap**

Son zamanlarda SAK sonrası ilk 72 saat içinde ortaya çıkan EBH'nin, SAK prognozunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bununla birlikte, EBH'nin karmaşık fizyolojisi arasında inflamatuvar cevabın öne çıktığı da gösterilmiştir (Miller vd., 2014). Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunun, çevredeki nöral hücrelerde doğrudan hasara sebep olduğu ve SAK sonrası beyin hasarını daha da kötüleştiren serebral ödemi şiddetlendirdiği belirlenmiştir (Sehba vd., 2012; Sercombe vd., 2002). Bu bilgiler, nöroinflamasyonun SAK sonrası kötü prognozda önem arz ettiğini ve baskılanmasının önemli teröpatik hedeflerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

### 1.3.1. TNF-a

TNF- $\alpha$ , sistemik inflamasyonda yer alan bir adipokin ve akut faz reaksiyonunu uyaran bir sitokindir. TNF- $\alpha$ , öncelikle aktive makrofajlar tarafından ve ayrıca CD4<sup>+</sup> lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve nöronlar gibi bir dizi başka hücre tipi tarafından üretilir. TNF- $\alpha$ 'nın birincil rolü bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesidir. TNF- $\alpha$ , ateş, kaşeksi, apoptotik hücre ölümü ve inflamasyonu indükleyebilen endojen bir pirojendir. Ek olarak, tümör meydana gelmesinde rolü vardır ve viral replikasyonu durdurabilir. IL-1 $\beta$  ve IL-6 üreten hücreleri indüklemeye yoluyla da sepsiste vücut savunmasında rol oynar. Ayrıca, TNF- $\alpha$ , çekirdeğe yer değiştiren ve hücrenin hayatta kalması ve çoğalmasıyla ilgili çok çeşitli proteinlerin bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunu teşvik edebilir (Hanafy vd., 2010; Wu vd., 2015; Young vd., 2012). Bu süreçler proanjyogenik faktörlerin varlığında ve proinflamatuvar genlerin ekspresyonunda artar.

TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediyatörlerin SAK komplikasyonlarının patogenezinde merkezi bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Jordan vd., 2010; Lucke-Wold vd., 2016; Rodríguez-Rodríguez vd., 2014). TNF- $\alpha$  seviyeleri SAK'tan sonraki ilk günlerde yükselir, muhtemelen endotel geçirgenliğini artıran ve beyin hasarına (Chou vd., 2012; Pantoni vd., 1998) ve ayrıca nöronal apoptoza aracılık eden inflamatuvar kaskadları aktive eder (Grell vd., 1994).

SAK'da anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerin araştırıldığı bir çalışma, mikroglial aktivasyonun, daha sonraki vazospazm ve nörodavranışsal bozuklukların ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Hanafy, 2013). Başka bir çalışmada ise SAK oluşturulan gruplarda TNF- $\alpha$  miktarının da arttığı gözlenmiştir (Hu vd., 2018). SAK'ın erken fazında, aktive olan mikroglialar tarafından proinflamatuvar sitokinler IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  salgılanır. Bunların fazla miktarda serbestlenmesi, mikroglial sinyalleme ile indüklenen astrosit sitotoksitesisi ile birlikte çevredeki hücreler için zararlı hale gelir (Sehba vd., 2012).

SAK modeli oluşturulan başka bir çalışmada ise proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu inhibe eden bir protein olan tristetraprolin (TTP) uygulamasının

nöroprotektif etkileri araştırılmış ve SAK'lı gruplarda TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Yin vd., 2018a). Buna ek olarak, TTP uygulaması Bcl-2 gen ekspresyonunu arttırmış ve TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 ve kaspaz-3'ünü ise azaltmıştır. Ayrıca, TTP uygulaması sıçanlarda nörolojik skorları iyileştirirken TUNEL<sup>+</sup> nöronların sayısını azaltmıştır. Öte yandan, TTP'nin susturulması, nöronal apoptozu arttırmış ve SAK'tan sonra nörolojik defisitleri ağırlaştırmıştır (Yin vd., 2018a).

### 1.3.2. IL-6

IL-6, mononükleer fagositler, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar ve astrositler gibi çeşitli hücreler tarafından sentezlenen, yaklaşık 24 kD'lik büyüklüğe sahip bir sitokindir (Mathiesen vd., 1993; Sawada vd., 1992). IL-6 sinyal yolağı genel olarak nöroinflamasyonda ve özellikle anevrizma oluşumu ve SAK patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (Simon ve Grote, 2021).

SAK hastalarında yüksek IL-6 seviyelerini ve nöroinflamasyonu hedefleyen potansiyel terapötik önlemler konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, IL-6 ve nöroinflamasyonu SAK patofizyolojisi ile ilişkilendiren standart bir klinik bakış açısı bulunmamaktadır. SAK hastalarında yüksek IL-6 seviyelerinin arkasındaki spesifik moleküler yollar ve bunların çeşitli etkileşimleri hala tanımlanmayı beklemektedir (Simon ve Grote, 2021).

Shao vd. tarafından yapılan bir çalışmada SAK'lı sıçanlara RES uygulamasının, TNF-a, IL-1 $\beta$  ve IL-6'nın mRNA ekspresyon düzeylerini azaltarak NF- $\kappa$ B aktivitesini inhibe ettiği ve anti-inflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle, TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın RES kaynaklı aşağı regülasyonun, NF- $\kappa$ B inhibisyonuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Shao vd., 2014). RES uygulamasının inflamatuvar sitokinlerin salınımı üzerindeki etkilerini değerlendiren başka bir çalışmada, SAK sonrası RES uygulamasının, IL-6, IL-1 $\beta$ , ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2016a). PST bir RES analogudur ve muhtemelen IL-6 üzerine baskılayıcı bir etki

gösterir. Ancak bugüne kadar SAK'ta PST'nin inflamasyon ve IL-6 üzerine etkilerini ortaya koyan çalışmalara rastlanılmamıştır.

### 1.3.3. IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$ , konakçıların doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir proinflamatuvar sitokindir. IL-1 $\beta$  aracılı inflamasyon, mikroplarla savaşmak ve doku onarım mekanizmalarına yardımcı olmak için gelişmiştir (Dinarello, 2011).

Nöroinflamasyonun merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilgili hastalıkların patogenezinde nedensel bir rolü olduğu giderek daha açık hale gelmektedir. Bu sebeple inflamatuvar araçların düzenlenmesini veya kullanılabilirliğini hedefleyen terapötik stratejilerin, patolojiyi önlemek veya hafifletmek için kullanılabilirliği araştırılmaktadır. IL-1 $\beta$ , bağışıklık tepkilerinin sürdürülmesinde ve multipl skleroz, nörodejeneratif hastalıklar, travmatik beyin hasarı ve diyabetik retinopati gibi çeşitli MSS hastalıklarında hastalık şiddetine katkıda bulunmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, IL-1 sinyallemesinin farmakolojik blokajının, bazı otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda faydalı olduğu ve böylece IL-1 $\beta$ 'nın nöroinflamatuvar koşullarda umut verici bir terapötik hedef haline geldiği gösterilmiştir (Mendiola vd., 2018).

Deneysel SAK'ta roflumilastın serebral inflamasyona karşı etkisini araştıran bir çalışma, uygulamanın 48 ve 72. saatte nörolojik eksikliği önemli ölçüde iyileştirdiğini, KBB geçirgenliğini, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerini artırdığı bununla beraber nöronal apoptozu azalttığını belirtmiştir (Wu vd., 2017). Bu sonuçlar, roflumilast kullanımı ile ortaya konulan anti-inflamasyon stratejisinin SAK sonrası nöronların korunmasını sağlayabileceğini göstermektedir.

SAK sonrası EBH'de RES uygulamasının teröpatik etkilerini inceleyen başka bir çalışmada, RES uygulanan gruplarda IL-1 $\beta$  seviyelerinin SAK gruplarına kıyasla azaldığı



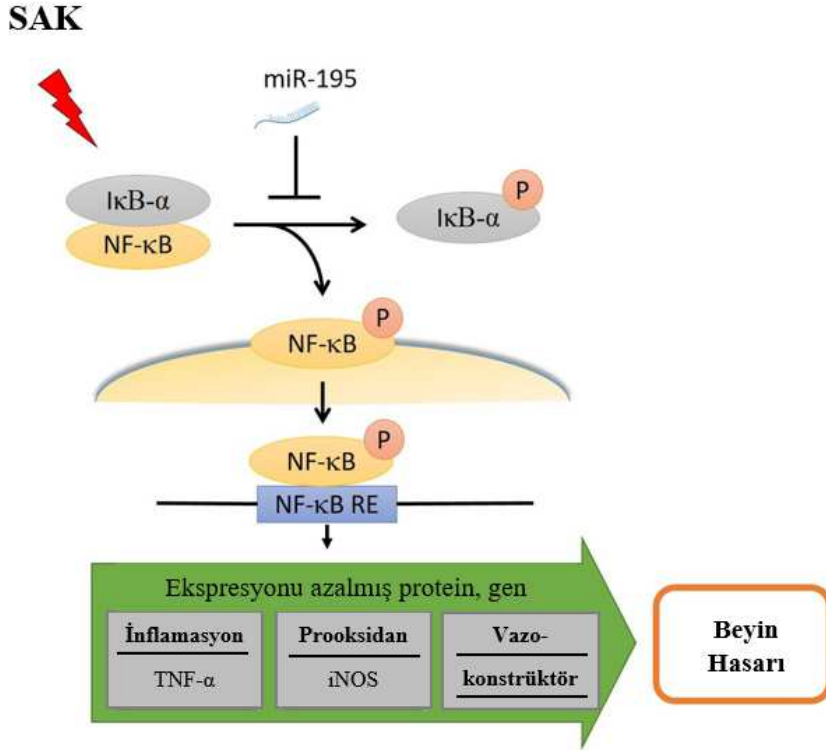
tespit edilmiştir (Zhang vd., 2017). Bu çalışma, RES'in, en azından kısmen NLRP3 (NACHT-, LRR- ve pirin alanı içeren 3) inflamatuvar sinyal yolu ile ilişkili inflamatuvar cevabı inhibe ederek EBH'ye karşı koruma sağlayabileceğini göstermiştir. Çalışma bulguları, RES'in SAK tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmüştür.

#### **1.3.4. NF-κB**

NF-κB inflamasyon, bağışıklık, hücresel proliferasyon ve apoptoz gibi önemli hücre süreçlerinin ana düzenleyicisidir. NF-κB kompleksleri, p50, p52, p65 (RelA), RelB ve c-Rel içeren çeşitli NF-κB ailesi üyelerinin homo veya heterodimerlerinden oluşur. NF-κB yolu, TNF-α ve IL-1β gibi inflamatuvar sitokinler; veya alternatif NF-κB yolunu tetikleyen CD40 ligandı ve lenfotoksin p gibi diğer uyarılar ile indüklenebilir (Gloire vd., 2006; Madonna ve De Caterina, 2012).

Yapılan çalışmalarda, NF-κB sinyal yolunun pasif yaralanma sonrası nekroz ve hücre hasarında rol oynadığı, inflamatuvar sitokinleri salgılamak için mikrogliayı aktive ettiği ve inflamatuvar cevap kaskadının amplifikasyonuna neden olduğu bulunmuştur (You vd., 2016; Pawlowska vd., 2018).

SAK sonrası miR-195-5p uygulamasının teröpatik etkileri ve altta yatan mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, miRNA-195-5p'nin, eNOS miktarını arttırarak, iNOS'u azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun NF-κB sinyal yolunda meydana gelen inhibisyon ile SAK kaynaklı vazospazmı azalttığı bulunmuştur (Tsai vd., 2021). Aynı zamanda miR-195-5p, dentat girusta SAK kaynaklı apoptoza bağlı TNF-a ekspresyonunu azaltarak nöronları da korumuştur. Araştırmacılar miR-195-5p'nin, SAK kaynaklı serebral vazospazm ve beyin hasarını yönetmek için potansiyel olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.



Şekil 3. MiR-195-5p'nin, NF-κB sinyal yoluyla SAK sonrası etkilerinin şematik gösterimi (Tsai vd., 2021).

### 1.3.5. TLR4

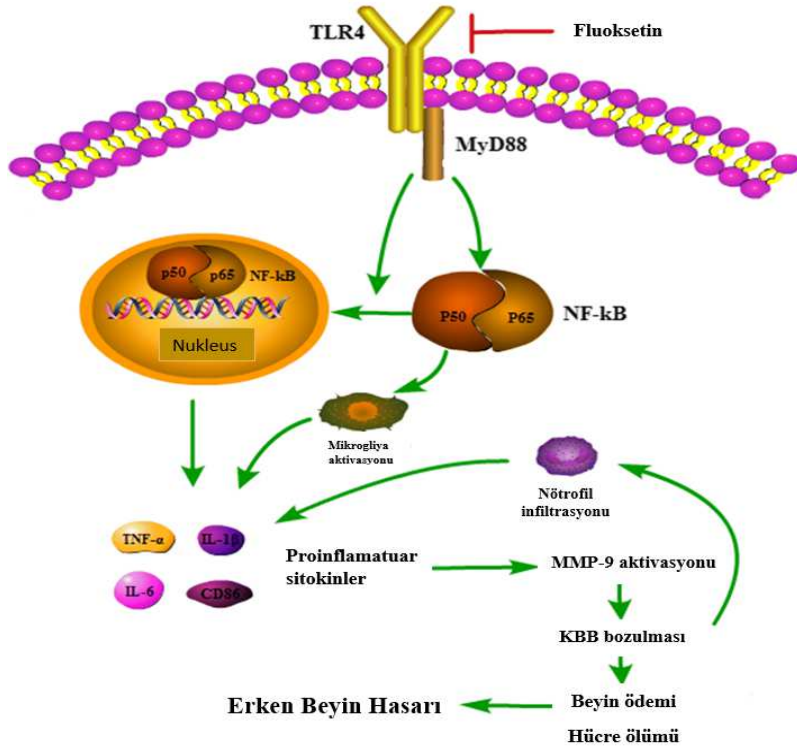
TLR'ler, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler) adı verilen çeşitli mikrobiyal yapısal bileşenleri tanıır. PAMP'lerin tanınması üzerine TLR'ler, enfeksiyonu ortadan kaldırmaya yardımcı olan proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini tetikler. Şimdiye kadar, on ikisi farelerde ve on tanesi insanlarda eksprese edilen on üç TLR memelilerde tanımlanmıştır (Pióciennikowska vd., 2015).

TLR'ler, transmembran sinyal iletim molekülleri olarak, lipopolisakkarit (LPS) ve yüksek mobiliteli grup kutusu 1 (HMGB1), ısı şok proteinleri (HSP70) gibi endojen ligandlar dahil olmak üzere korunmuş mikrobiyal motifleri tanıyabilir (Tahara vd, 2006;

Cao vd, 2007). Bu TLR'ler arasında, TLR4, en çok çalışılan reseptörlerden biridir ve aşağı akış kritik adaptör protein miyeloid farklılaşma faktörü 88'i (MyD88) ve NF-κB'yi aktive edebilen, proinflamatuvar sitokinler üretebilen ve inflamatuvar yanıtı uyarabilen bir reseptördür (Wang vd, 2013; Lu vd, 2018).

Önceki çalışmalar, TLR4'ün yüksek düzeyde düzenlendiğini ve esas olarak beyin hasarından sonra mikroglia da ifade edildiğini göstermiştir (Zhang vd, 2016; Rosciszewski vd, 2018). Bu nedenle, TLR4 aktivasyonunun baskılanması, SAK sonrası nöro-inflamasyona karşı uygulanacak bir yöntem olarak düşünülebilir.

Seçici serotonin geri alım inhibitörü olan fluoksetin uygulamasının SAK sonrası EBH'de iyileştirici etkilerini inceleyen bir çalışma, fluoksetinin proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azalttığını tespit etmiştir (Liu vd., 2018). Araştırmacılar, altta yatan mekanizmanın ise TLR4/MyD88/NF-κB sinyal yolunu içerdiğini belirtmişlerdir.



Şekil 4. TLR4/MyD88/NF-κB sinyal yolu aracılığıyla fluoksetinin anti-inflamatuar etkilerinin potansiyel moleküler mekanizmalarının şematik gösterimi (Liu vd., 2018).

### 1.3.6. p53

p53, apoptoz için ana düzenleyici proteinlerden biridir. p53'ün sitoplazmada, hücre zarında bulunan bir ölüm reseptörü aracılığıyla hareket eden TNF-α tarafından stabilize edildiği kanıtlanmıştır (Nijhawan vd., 2000). p53'ün sitozolde fosforilasyonu ve ardından stabilizasyonu, apoptotik kaskadların başlatılmasına izin verdiği için önemlidir (O'Brate ve Giannakakou, 2003).

p53'ün apoptozdaki işlevinin sitokrom C'nin mitokondriden salınmasını kontrol eden Bcl-2 protein ailesi aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir (Antonsson ve Martinou, 2000). Sitokrom C'nin salınması, prokaspaz-3'ü kaspaz-3'ü oluşturmak üzere parçalayan apoptozomun oluşturulması ile sonuçlanır. Kaspaz-3'ün hem harici hem de dahili apoptotik

basamaklar için son ürün olduğu bilinmektedir. Kaspaz-8, kaspaz bağımlı yol aracılığıyla kaspaz-3'ü doğrudan etkileyebilir. Son olarak, p53'ün, kaspaz bağımsız yolu temsil eden mitokondriden AIF (apoptoz indükleyici faktör)'in salınmasıyla sonuçlandığı da gösterilmiştir (Cregan vd., 2002). Nitekim sadece p53'ün inhibisyonu yapıldığında, sadece bu proteinlerde önemli bir azalma ortaya çıkmıştır ve bu durum apoptotik sürecin genel olarak azalması ile sonuçlanmıştır. Yukarıda elde edilen veriler bu kaskadların bir dereceye kadar p53'e bağlı olduğunu düşündürmüştür.

p53, SAK sonrası apoptozu uyaran bir protein olmasının yanında aynı zamanda hidrosefali gelişiminde de rol alan bir moleküldür. SAK'ı takiben artan p53'ün, matris metalloproteinaz-9'un ekspresyonunu ve aktivitesini yukarı regüle edebilmesi ve böylece KBB bütünlüğünün bozulmasına yol açtığı, bunun da ödem ve sinir hücre hasarı ile sonuçlandığı belirtilmiştir (Zhou vd., 2005). Bu nedenle, p53 sadece SAK sonrası apoptozu değil aynı zamanda ödemi de düzenleyen bir protein olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle p53'ün etkinliğini hedef alan farmakolojik ajan uygulamasının SAK sonrası sinir hasarını azaltıcı çalışmalar için aday moleküller olabileceği ileri sürülmüştür. Bu alanda özellikle, p53'ün transkripsiyon sonrası düzenleme modu konusunda ilerlemeler kaydedilmiştir (Cahill vd., 2007). Nitekim, proapoptotik bir role sahip olan asetillenmiş p53 protein seviyelerinin, serebral iskemiye takiben sıçanların hipokampal bölgesinde belirgin şekilde arttığı doğrulanmıştır (Yan vd., 2012). Ek olarak, asetillenmiş p53'ün proapoptotik etkilerinin, SIRT1 tarafından deasetilasyon yoluyla hafifletilebileceği de bildirilmiştir. p53, SIRT1'in histon olmayan bir substratıdır ve SIRT1, p53'ün deasetilasyonu yoluyla apoptozu inhibe edebilir (Yan vd., 2008).

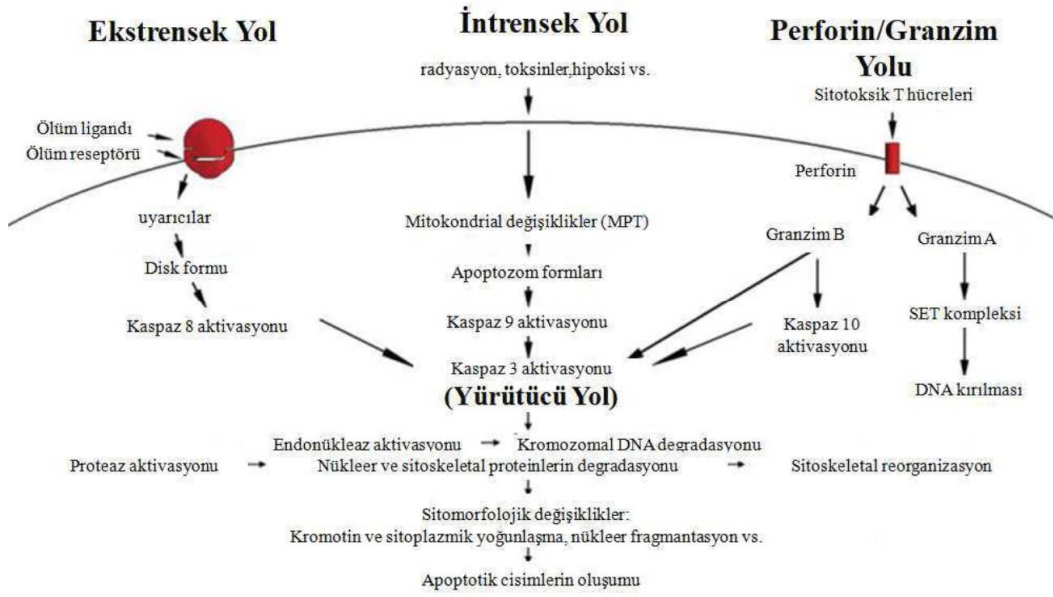
#### **1.4. Apoptoz**

Yunanca'da yaprakların düşmesi anlamına gelen apoptozis (a-po-toe-sis), Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ilk kez 1972 yılında literatüre kazandırılmıştır. Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz normal hücre döngüsü, immün sistemin işleyişi ve gelişimi, neonatal gelişim, hormona bağlı atrofi ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü dâhil olmak üzere türlü süreçlerde önem taşıyan bir mekanizmadır (Elmore, 2007).

Apoptoz, homeostatik bir mekanizma olup gelişim ve yaşlanma boyunca doku ve hücreleri korur. Bağışıklık tepkilerine benzer şekilde apoptoz, bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkabilir. Böyle zamanlarda apoptoz, hücrelerin hastalık ve zararlı maddeler tarafından hasar gördüğü durumlarda yararlı bir mekanizma olarak değerlendirilir (Norbury ve Hickson, 2001).

Çalışmalarda, ekstrinsik ve intrinsik yolak olmak üzere birbirine bağımlı iki apoptoptik yolak bildirilmiştir. Apoptozun regülasyonunda; kalsiyum, seramid, p53, kaspazlar, sitokrom-c, Bcl-2 ailesi gibi moleküller görev alır (Igney ve Krammer, 2002; Martinvalet vd., 2005).

Apoptoz esnasında kaspaz aktivasyonu iki yolla ortaya çıkar. Ekstrinsik yol, TNF- $\alpha$ , TRAIL ve CD95 ligand dâhil olmak üzere çeşitli apoptoz indükleyici sitokinlerin kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlayan ilgili reseptörlerine bağlanması ile aktive olur (Peter ve Krammer, 2003). İntrensik (mitokondriyal) yol, sitokrom-c ve mitokondriyal zarlar arası boşluk proteinlerinin, sırasıyla kaspaz-9'u aktive etmesi ve apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) sitozole salınması ile etkili hale gelir. Aktive edilmiş kaspaz-8 ve kaspaz-9, bundan sonra ortak son yolda bulunan efektör kaspazları indükler. Bu aktivasyon ise hücrede apoptozun başlaması ile neticelenir (Lindsten vd, 2000; Reed, 2000).

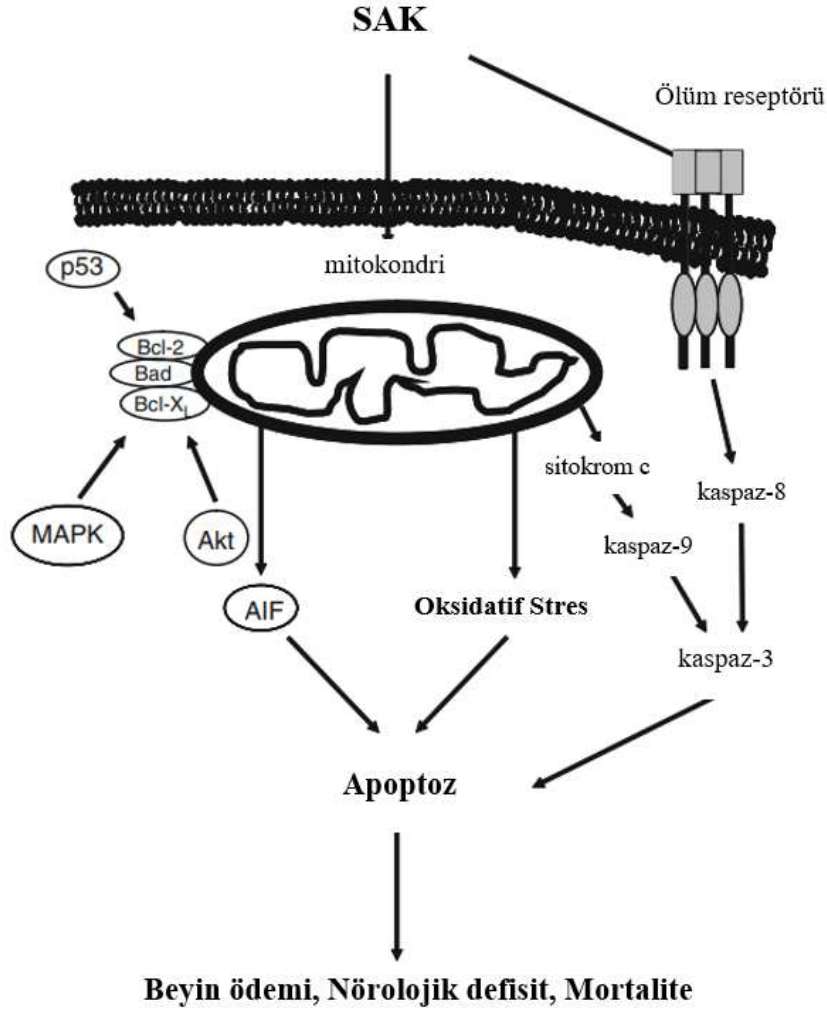


Şekil 5. Apoptoz yolları (Elmore, 2007).

#### 1.4.1. Kaspazlar ve Kaspaz-3

Apoptoz, bir dizi sistein-aspartik proteaz olan kaspazların aktivasyonu ile başlar. Bu kaspazlar başlatıcı, uygulayıcı ve inflamatuvar olmak üzere üç grupta incelenir (Elmore, 2007). Hücre hasarı ortaya çıktığında, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve 9) aktifleşir ve uygulayıcı kaspazların (kaspaz- 3, 6 ve 7) aktif form gelmesini sağlarlar. Uygulayıcı kaspazların aktivasyonu, bir dizi olayı tetikler. Bu süreçte endonükleazlar aktif hale gelir, nükleer proteinler ile hücre iskeleti yıkımlanır ve proteinlerin çapraz bağlanması azaltılır. Bu durumda fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu görülür (Poon vd., 2014). Apoptozda önemli bir özne olan ise kaspaz-3'tür. Kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10 ve granzim B aktivasyonu ile kaspaz-3 etkisini göstermektedir (Fan vd., 2005).

SAK patogenezinde nöronal apoptoz önemli bir rol oynamaktadır (Edebalı vd., 2014). Kaspaz-3, apoptozun ana efektörlerinden biridir ve kaspaz-3'ün aktivasyonu, geri dönüşümsüz hücre apoptozunu gösterir (Yu vd., 2014) . SAK oluşturulup, hipokampusta kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 dahil apoptozla ilişkili faktörlerin ekspresyon seviyeleri araştırılan bir çalışmada bu faktörlerin SAK oluşturulan gruplarda arttığı görülmüştür (He vd., 2018).



Şekil 6. Subaraknoid kanamayı takiben nöronal apoptoza giden yolun şematik gösterimi (Hasegawa vd., 2011).

Başka bir çalışmada araştırmacılar, kaspaz inhibitörlerinin, SAK'dan sonra korteksin apoptozu ve bazal kaspaz protein ekspresyonunu azaltabileceğini, aynı zamanda nöro-davranışsal fonksiyonu ve beyin ödemi iyileştirebileceğini belirlediler (Gao vd., 2008). Bu sonuçlar, apoptozun SAK sonrası nöronal hasarda önemli bir rol oynadığını ve SAK sonrası baskılanmasının nöronların korunması için önemli stratejilerden biri olabileceğini düşündürmektedir.



### 1.4.2. Bcl-2 Ailesi Proteinleri

Apoptozda intrensek yolak, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından yönetilir. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri mevcuttur. Bu proteinlerin birçoğu fiziksel olarak birbirine bağlanır. Patolojik durumlarda hücrede Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri artış gösterir ve apoptoz süreci başlar (Reed, 1997). Yapılan çalışmalar sonucunda, Bcl-2 protein ailesinin 20'den fazla üyesi açıklanmıştır. Bcl-2 antiapoptotik bir protein olarak adlandırılırken Bax ise proapoptotik protein olarak adlandırılmıştır (Reed, 1996).

Bcl-2 proteini, apoptoz kontrolünde ve hücre sağkalımını artırmada oldukça önemli bir proteindir (Bruckheimer vd., 1998). Bcl-2 geni insan foliküler B hücresi lenfomalarının kromozomal kırılma bölgesinde tanımlanmıştır. Bcl-2 mitokondri, nükleer membranlar ve endoplazmik retikulumda, ayrıca reaktif oksijen türlerinin oluşum alanlarında lokalizedir. Bcl-2 hücrelerde oksidatif hasarı engeller (Korsmeyer vd., 1993). Bcl-2'nin proliferasyonu teşvik etmekten ziyade programlanmış hücre ölümünü engellediği belirlenmiştir (Korsmeyer, 1999).

Apoptoz, bir tür programlanmış hücre ölüm yoludur ve SAK tarafından indüklenen EBH'de çok önemli bir rol oynar. Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Bax, Bak, Bad ve Bcl-XS), intrinsik apoptotik yol boyunca kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi de içeren aşağı akış efektör kaspazlarını daha fazla tetiklemek için kaspaz-9'u aktive eder (Datta vd., 2020). İyi bilindiği gibi, Bax ve kaspaz-3'ün yukarı regüle edildiği SAK'tan sonra hücre apoptozu artar, apoptotik bir inhibitör olan Bcl-2 ise aşağı regüle edilir.

Prekiazmatik sistemaya kan enjeksiyonu modeli ile SAK oluşturulan sıçanlarda apoptotik yolların araştırıldığı bir çalışmada, Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ve SAK oluşturulan grupta Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Li vd., 2017).

Başka bir çalışmada, endovasküler perforasyon yöntemi ile SAK oluşturulan sıçanlarda Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve yine SAK oluşturulan gruplarda Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin diğer gruplarla göre azaldığı gözlenmiştir (Chen vd., 2021).

Bu sonuçlar nöronal dejenerasyonu ve apoptozu azaltmak için uygulanan moleküllerin etkisini değerlendirmek amacı ile yapılan araştırmalarda Bcl-2'yi hedef bir protein haline getirmiştir.

#### **1.4.3. Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax)**

Bcl-2 ile ilişkili X proteini, Bcl-2'nin homolog bağlanma partneri olarak tanımlanmıştır. Bcl-2'nin tersine apoptozu teşvik eder (Edlich, 2018). Bax'lar intrinsek apoptotik yolun aşağı akış uyararı olarak kabul edilirler. Bununla birlikte, Bax ekspresyon seviyesinin azaldığı durumlarda çoğu apoptotik reaksiyonun ortadan kalktığı görülmüştür. Aksine aktive olduklarında, Bax dış mitokondriyal membranı geçirgen hale getirirler. Ardından kaspazları aktive eden sitokrom-c gibi proapoptotik faktörlerin serbest bırakılmasına sebep olurlar (Wong ve Puthalakath, 2008).

Hayatta kalma yanlısı protein Bcl-2, kaspazların aktivasyonunu veya bölünmesini düzenlediğinden ve proapoptotik proteinler Bax ve Bad'in oluşumunu daha da baskıladığından, Bcl-2'nin Bax'a oranı genellikle hücrenin hayatta kalımını belirleyen en önemli olaydır (Wu vd., 2022). Dikkat çekici bir şekilde, bir çalışma SAK'dan sonra apoptozun anevrizma oluşumuna, vazospazma ve EBH'ye katıldığını göstermiştir (Hara vd., 1998). Global iskemiden sonra, SAK'lı hastalar vaskülatürde, KBB'de ve beyinde apoptoz sergilerler (Wu vd., 2021).



Şekil 7. Subaraknoid kanamadan sonra apoptotik basamaklar (SAK: subaraknoid kanama, IKB: intrakraniyel basınç, SKA: serebral kan akımı; Hasegawa vd., 2011)

SAK modeli oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada SAK sonrası apoptoz değerlendirmesi için Bax gen ekspresyonu düzeyi belirlenmiş ve bu değerde bir artış olduğu gözlenmiştir (Qian vd., 2021).

Zhang vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada, SAK sonrası EBH'de, Bax ve kaspaz-3'ün ekspresyon seviyeleri arttığı, Bcl-2 ise özellikle 48. saatte, SAK'dan sonra azaldığı belirlenmiştir (Zhang vd., 2022).

#### 1.4.4. SIRT-1

SIRT1 gibi sirtuinler, korunmuş protein NAD<sup>+</sup> bağımlı deasilazlardır ve bu sebeple işlevleri hücrel metabolizma ile bağlantılıdır. Memelilerde yedi adet SIRT tanımlanmıştır ve SIRT1 bu aileden en çok araştırılan proteindir (Hwang vd., 2013). Birçok çalışmada,

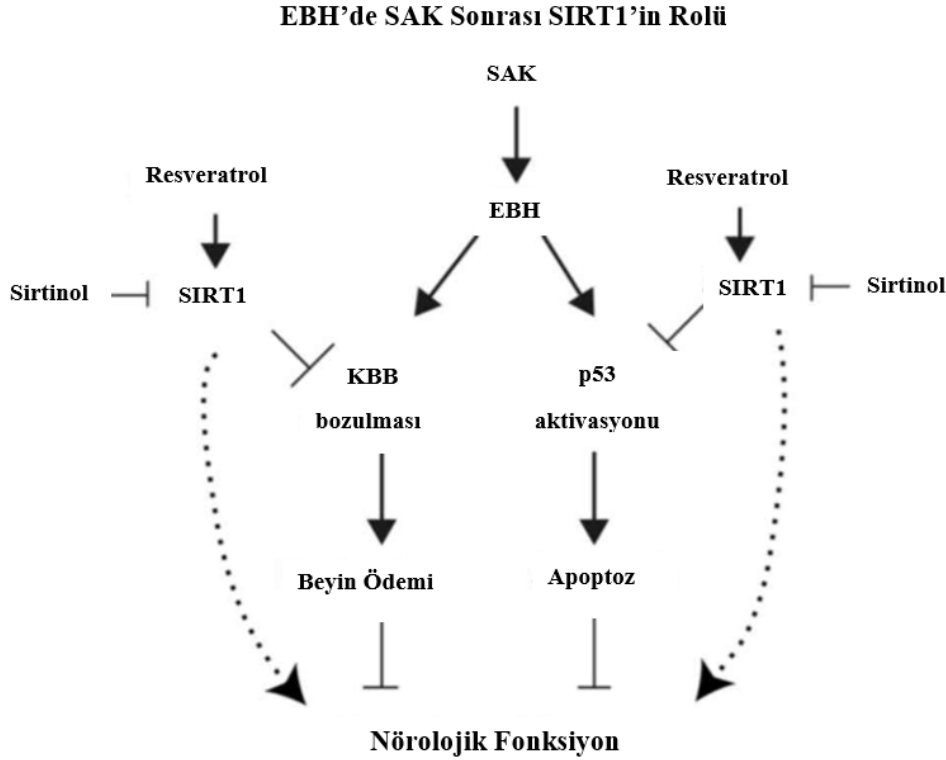
SIRT1'in oksidatif stres, başışıklık tepkisi, mitokondriyal biyogenez ve apoptoz/otofaji gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları modüle edebileceğini ortaya koymuştur (Donmez, 2012). Serebral iskemi, travmatik beyin hasarı, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında SIRT1, metabolizma, stres direnci ve genomik stabilitedeki işlevleri nedeniyle koruyucu etkiler gstermiştir. Son yirmi yılda, biriken kanıtlar sirtuinlerin enerji durum sensörleri olmasının yanı sıra hücrelerin çeşitli durumlarda sağ kalımına yardımcı olan faktörler olduğunu da ortaya koymuştur. Bu durumlardan en önemlisinin metabolik stresler olduğu ifade edilmektedir. (Wang vd., 2013; Herskovits ve Guarente, 2014).

Sirtuinler yaşlanma sürecini düzenler ve kendileri de diyet ve çevresel stres tarafından düzenlenir. Sirtuinlerin ve daha spesifik olarak SIRT1'in çok yönlü işlevleri, hücrelerin çekirdek, sitoplazma ve mitokondrideki enerji seviyelerindeki değişiklikleri algılamasına izin veren çeşitli hücresel konumlarıyla desteklenir. SIRT1, karaciğer, kas, yağ dokusu, kalp ve endotel dahil olmak üzere çok sayıda dokudaki birçok hedef proteini deasetilleyerek metabolik süreçlerin sağlıklı bir şekilde işleyişinde kritik bir rol oynar. (Chang ve Guarente., 2014).

SIRT1, merkezi sinir sistemi yaralanmasında kritik bir rol oynar. SIRT1'in inhibisyonu, felçten sonra beyin hasarını şiddetlendirir (Zhou vd., 2014a). Ayrıca, bir çalışmada, SIRT1'in aktivasyonunun, NF-κB sinyalini baskılayarak beyin hasarını hafifletebileceği de bildirilmiştir (Zhang vd., 2016b).

SIRT1/p53 sinyalinin kanser hücresinin apoptozu üzerinde önemli bir düzenleyici olduğu kanıtlanmıştır. SAK modeli oluşturulan sıçanlarda SAK sonrası SIRT1 gen ekspresyonları düzeyinde gözlemlenen artışlar, SIRT1/p53 sinyal yolağının, SAK sonrası hücre apoptozunda etkili olduğunu düşündürmüştür (Zhou vd., 2014a). Bu çalışmada, p53 deasetilasyonu ve anti-apoptoz üzerindeki etkilerini artırmak için SIRT1'in spesifik bir aktivatörü olan RES kullanılmıştır. Gruplardan bir tanesine ise RES'in etkilerini bloke etmek için spesifik bir SIRT1 inhibitörü olan sirtinol uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar,

RES gibi SIRT1 aktivatörlerinin önümüzdeki yıllarda SAK'a bağlı erken beyin hasarının azaltılmasında potansiyel aday moleküller olacağını göstermiştir.

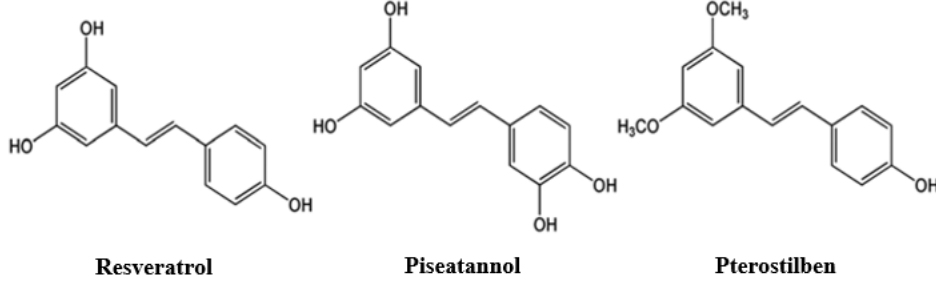


Şekil 8. Subaraknoid kanamayı takiben erken beyin hasarında SIRT1'in rolünün şematik gösterimi (SAK: subaraknoid kanama, EBH: erken beyin hasarı; Qian vd., 2017).

### 1.5. Piseatannol

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, özellikle bitki özlerinden elde edilenler olmak üzere, nörodejeneratif hastalıklar için çok sayıda doğal bileşiğin terapötik potansiyelinin araştırılmasına odaklanmıştır (Wasik ve Antkiewicz-Michaluk, 2017). Tarih boyunca, bazı bitkilerin tıbbi kullanımına ilişkin atalara dayanan geleneksel yaklaşım, bitkilerden izole edilen sayısız özüt ve bileşiğin etki mekanizması ve güvenliği üzerine yapılan çalışmaların temeli olmuştur (Anton vd., 2008, More vd., 2013). Doğal bileşiklerin kullanımının farmakolojik çekiciliği ve sınırlı yan etkileri, nörodejenerasyona sebep olanlar gibi çok faktörlü hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için özellikle yararlı olan çoklu hedef etki mekanizmaları etrafında döner (Bağlı vd., 2016; Pohl ve Kong Thoo Lin, 2018).

Stilbenler, başlıca RES, PST ve pterostilben (PT) olmak üzere üzüm gibi bazı meyvelerde bulunan türevleri ile temsil edilen bir dizi gıda kaynaklı biyoaktif doğal üründür (Pawlus vd., 2013).



Şekil 9. Üç stilbenin kimyasal yapıları (resveratrol, piceatannol, pterostilben; Fu vd., 2016).

Tüm stilbenler arasında en yaygın ilgiyi RES almıştır. RES'in, Huntington hastalığı ve felçler dahil olmak üzere nörolojik bozuklukları düzenlediği ve ayrıca nöronları Alzheimer hastalığının önemli patolojik semptomları olarak kabul edilen apoptoza karşı koruduğu kanıtlanmıştır (Rivière vd., 2010). Ancak diğer stilbenlerin, PST ve PT gibi, RES'den daha üstün nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

PST (3,3',4,5'-trans-tetrahidroksistilben) çilek, yer fıstığı, üzüm ve beyaz çayda bulunan ve doğal olarak oluşan bir stilbendir (Seyed vd., 2016). Modern farmakolojik çalışmalar, PST'nin antioksidan, anti-inflamatuar, anti-mutajenik ve anti-diyabetik etkilerini araştırmaktadır (Piotrowska vd., 2012).

RES fenil halkalarındaki hidroksil gruplarının sayısının artırılması, suda çözünürlüğünü ve farmakolojik aktivitesini arttırmak için ilginç bir stratejidir (Saiko vd., 2008; Latruffe ve Vervandier-Fasseur, 2018).

Genel olarak, stilben kısmında üçten az hidroksil grubu içeren polihidroksillenmiş türevler, çok düşük oral biyoyararlanım sergiler (Chen vd., 2015). Ancak oksiresveratrol ve piseatanol gibi dört hidroksil grubuna sahip bileşikler (PST; 3,3',4,5'-trans-tetrahidroksistilben) RES'den daha iyi suda çözünürlük, daha hızlı absorpsiyon ve daha yüksek biyoyararlanım gösterir (Setoguchi vd., 2014; Chen vd., 2016).

Setoguchi vd. intragastrik uygulamadan sonra PST'nin sıçanlarda RES'den 2 kat daha yüksek seviyelerde emildiğini göstermiştir. Bu çalışma ayrıca PST'nin, PST için en iyi biyolojik aktiviteyi öngören RES'den daha yüksek bir metabolik stabilite sunduğunu gösterir (Setoguchi vd., 2014).

En çok çalışılan hidroksillenmiş RES analoglarından biri PST'dir. Zhang vd. bu bileşiğin farelerde D-galaktoz kaynaklı yaşlanma üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçlar, PST tedavisinin spontan motor aktiviteyi koruduğunu ve uzamsal öğrenme ve hafıza becerilerini geliştirmesinin yanı sıra nöronal kaybı önlediğini, oksidatif stresi azalttığını ve hipokampus ve kortekste hücre çoğalmasını desteklediğini göstermiştir (Zhang vd., 2018).

Tüm bunların ışığında, PST'nin nöroprotektif aktivitesi daha fazla ilgiyi hak etmekte ve altta yatan mekanizmanın daha fazla araştırılması gerekmektedir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Subaraknoid kanamalar (SAK) insanlarda yaygın olarak görülmekte ve beyin hasarına bağlı fonksiyon kaybı ve ölümlere yol açmaktadır. SAK yaygın görülmesine rağmen halen kesin bir tedavisi yoktur. Bu nedenle SAK'a bağlı ölüm oranlarını azaltmak, fonksiyon kayıplarını önlemek veya SAK sonrası iyileşmeyi hızlandırıcı ajanların belirlenmesine yönelik deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. SAK konusunda yapılmış yoğun çalışmalar sonucunda hastalığın altında yatan etmenler ve moleküler mekanizmaların bir kısmı ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda daha çok inflamasyon ve apoptoz üzerinde yoğunlaşmış ancak hastalık karşısında kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bu nedenle, SAK tedavisi için etkili anti-inflamatuar ajanlarının araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda farmakolojik olarak etkinliği kanıtlanmış klasik ilaç tedavilerinin yanı sıra adjuvant tedavisi olarak isimlendirilen tamamlayıcı tedaviler de araştırılmaktadır. Son yıllarda özellikle anti-inflamatuar etkileri bilinen ve bir polifenol olan PST konusunda yaygın araştırmalar bulunmaktadır. Özellikle anti-inflamatuar etkileri ile PST, SAK tedavisinde aday bir molekül potansiyeli taşımaktadır. Projemiz, deneysel SAK modelinde PST uygulamasının apoptoz ve inflamasyon üzerindeki etkilerinin incelendiği ilk çalışma niteliğinde olacaktır. Bu nedenle, proje ile, deneysel SAK modeli oluşturulan sıçanlarda PST uygulamasının anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkilerinin incelenmesi ve altta yatan bazı moleküler mekanizmaların ortaya konulması amaçlanmıştır.

#### 2.1. Subaraknoid Kanama ve Piseatannol

SAK patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamakla birlikte oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz hastalığın oluşumundaki temel etkenlerdendir. Yapılan araştırmalar çeşitli hastalıklarda PST'nin bir tedavi seçeneği olarak potansiyelini ortaya koymuştur.



Bir çalışmada, LPS ile indüklenen akut akciğer hasarı (AAH)'na karşı PST uygulamasının potansiyel koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Mekanizma, LPS'nin neden olduğu hava-kan bariyeri hasarı ve TLR4/NF-κB sinyal yolu aktivasyonunun inhibisyonu ile ilgili olup PST'nin AAH'yi tedavi etmek için etkili bir ajan olabileceği bildirilmiştir (Peng vd., 2020).

Başka bir çalışmada, PST'nin iskemik reperfüze sıçan kalplerinde anti-aritmik ve kardiyoprotektif aktivitelerle bağlantılı olarak serbest radikallerin azaltılmasında RES'den daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2009).

Lösemi hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada PST uygulaması antioksidan aktivite göstermiştir ve ayrıca PST'nin PI3K/AKT/mTOR yoluyla osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu ve indüklenen apoptozu baskıladığı bildirilmiştir (Ovesná vd., 2006; Wang ve Li, 2020a)

Zhou vd. tarafından yapılan çalışmada ise PST uygulamasının serebral endotel hücreleri üzerindeki NF-κB ve MAPK sinyal yollarını inaktive ederek inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığını belirtilmiştir (Zhou vd., 2022a).

PST'nin SAK tedavisindeki rolü konusunda bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu konu ile ilgili olarak sadece 2015 yılında yayınlanmış bir makale bulunmaktadır. Bu çalışma, PST'nin SAK'a karşı potansiyel koruyucu etkilere sahip bir molekül olacağına dair bilgiler sunmaktadır. Yapılan çalışma, ilk kez Mincle/Syk sinyal yolunun SAK sonrası doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ve nöroinflamasyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte çalışmada altta yatan moleküler mekanizmalar konusunda yeterli bilgi verilmemiştir (He vd., 2015).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan onay (30.10.2020 toplantı tarihli ve 2020/09-03 sayılı karar) ile yürütülmüş olup araştırmanın hayvan deneyleri aşaması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM)'nde gerçekleştirildi.

#### 3.1 . Hayvan Materyali

Çalışmada, ÇOMÜDAM'dan temin edilen 27 adet 7-8 haftalık 200-300 gram ağırlığında Wistar Cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar davranış, solunum ve kardiyovasküler sistem yönünden klinik muayeneden geçirilmiş olup herhangi bir olumsuzluk tespit edilmedi. Hayvanlar, deney süresince yaklaşık olarak 22°C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve havalandırması mevcut bir ortamda muhafaza edildi ve ad-libitum olarak beslendi.

##### 3.1.1. Grupların Oluşturulması

Çalışmada kullanılan sıçanlar ağırlıklarına göre her bir grupta rastgele seçilen 9 sıçan olmak üzere toplam 3 gruba ayrıldı (Tablo 1).

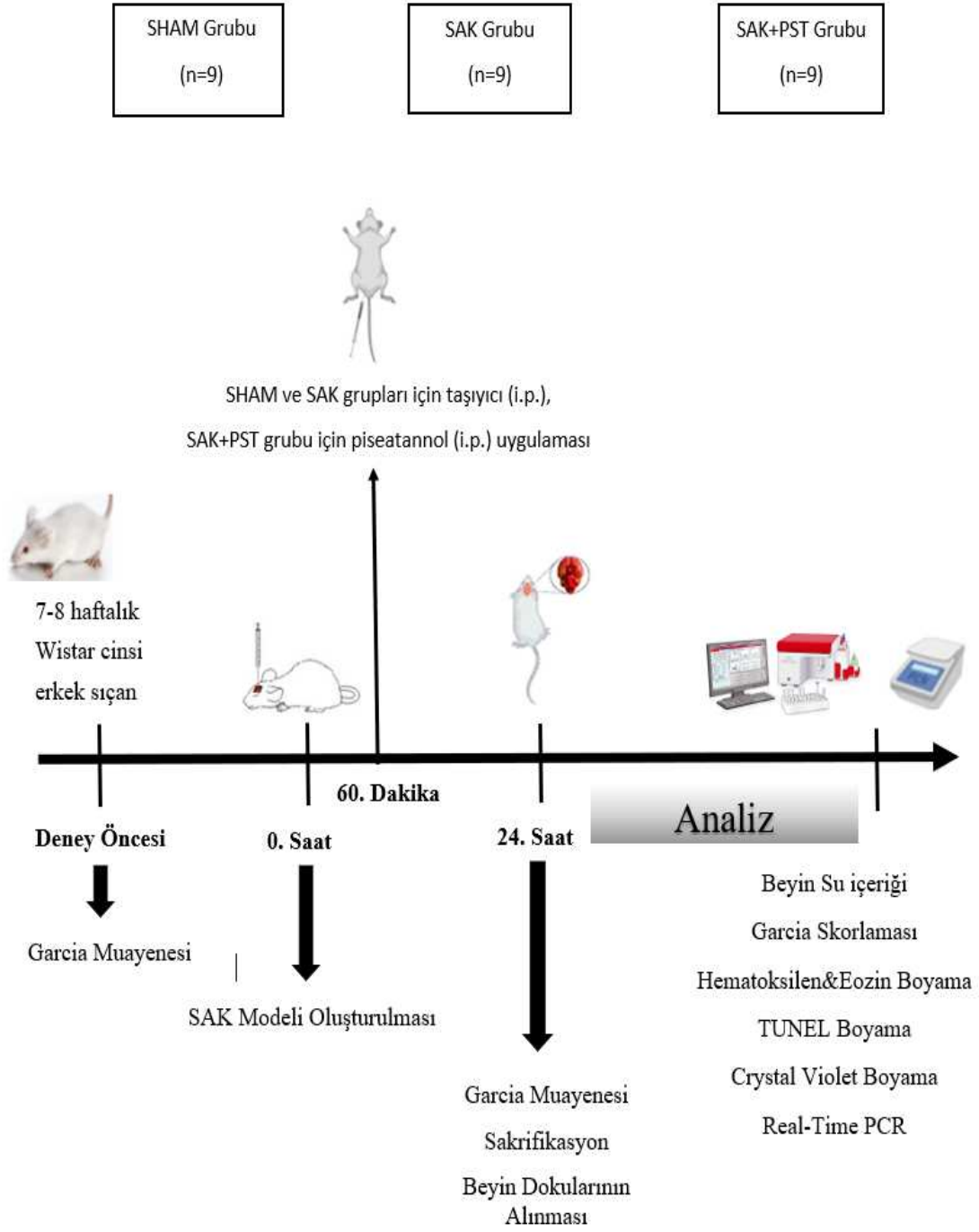
Tablo 1.

Hayvanların Gruplandırılması ve Yapılan Uygulamalar

Gruplar	Yapılan İşlemler
<b>Grup 1- SHAM Grubu (n=9)</b>	SAK grubundaki tüm işlemler bu grupta da yapılmış olup farklı olarak aynı büyüklükte bir iğne ile prekiomatik sisterna bölgesine ulaşıldıktan sonra kan verilmedi. Ancak iğne çıkarılmadan önce burada 10 saniye bekletildi. PST ihtiva etmeyen taşıyıcı solüsyon PST verilme sıklığına göre ve aynı yolla uygulandı.
<b>Grup 2- SAK Grubu (n=9)</b>	Bu grupta SAK modeli oluşturuldu. Kuyruktan alınan 120 µl heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan prekiomatik sisternaya 10 saniyede enjekte edildi. Bu gruptaki hayvanlara da PST ihtiva etmeyen taşıyıcı solüsyon piseatanol verilme sıklığına göre ve aynı yolla uygulandı.
<b>Grup 3- SAK+PST Grubu (n=9)</b>	SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra intraperitoneal yolla PST (30 mg/kg dozda, % 2'lik etanol içeren distile su içerisinde çözüldürülerek) verildi.

### 3.2. Deney Planı

Gruplar oluşturulduktan sonra tüm sıçanlar Garcia nörolojik muayenesine tabi tutuldu. Muayene deneysel işlemlerden sonra 24. saatte tekrar edildi. Çalışmamızda her bir hayvana deney boyunca yapılan işlemlerin şematik gösterimi Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. Deney planının şematik gösterimi.

### **3.3. Anestezi İşlemi**

SAK modeli oluşturulması için sıçanlara öncelikle kas içi ketamin hidroklorür (60-80 mg/kg; Ketazol-Richter Pharma AG) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg; Xylazin Bio % 2-Bioveta) kullanılarak anestezi uygulandı.

### **3.4. Piseatannol Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulanması**

Belirlenen miktar PST (Cayman Chemical; Cat. No: 10083-24-6) hassas terazide tartıldı. Tartılan kimyasal her bir hayvan için ayrı hazırlanan ependorf tüplere konuldu. Doz ayarlaması sıçan ağırlıkları göz önünde bulundurularak yapıldı. Ardından tüplerin üzerine absöüt etanol ilave edildi ve distile su ile seyreltildi. Bu gruptaki hayvanlar için 30 mg/kg dozunda PST, % 2'lik etanol içerisinde vorteks yardımıyla çözündürölüp uygulamaya hazır hale getirildi. PST belirtilen dozlarda deney sırasında taze olarak hazırlandı ve hemen uygulandı. Hazırlanan çözelti SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra SAK+PST grubuna intraperitoneal olarak uygulandı.

### **3.5. Taşıyıcı Hazırlanması ve Uygulanması**

Taşıyıcı uygulaması için, etanol distile su içerisinde seyreltilerek intraperitoneal olarak uygulandı. Taşıyıcı içerisindeki nihai etanol konsantrasyonu % 2 olarak belirlendi. SHAM ve SAK gruplarındaki hayvanlara operasyon sonrası 60. dakikada taşıyıcı solüsyon uygulaması yapıldı.

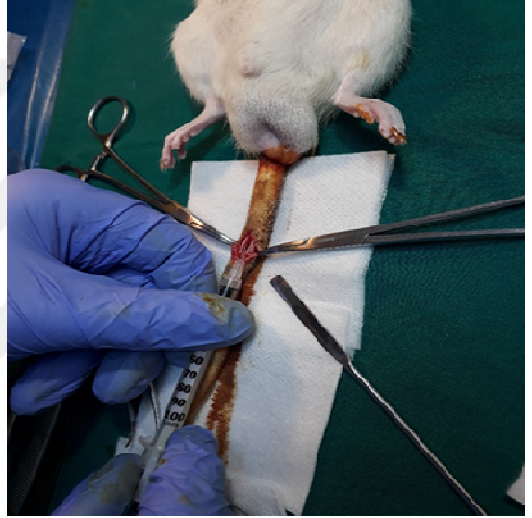
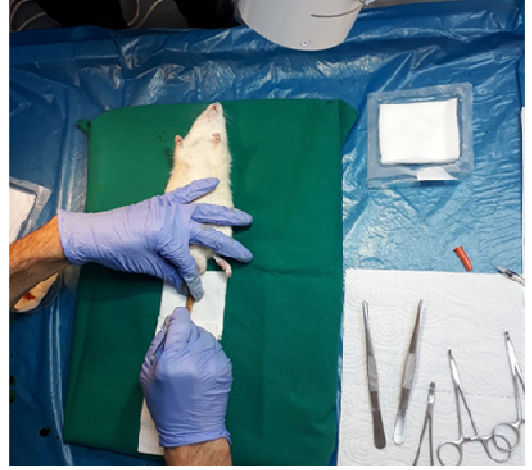
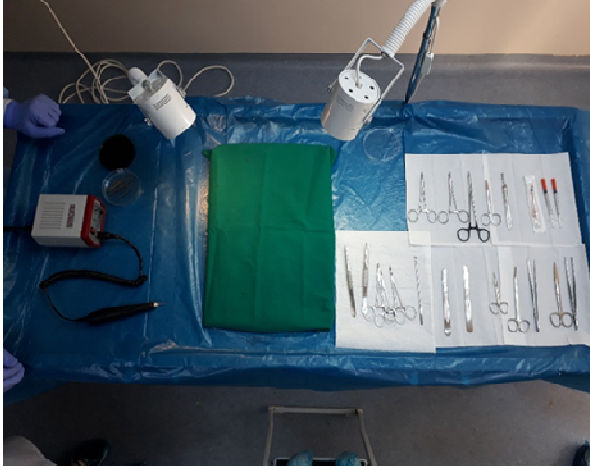
### **3.6. Yöntem**

Çalışmamız boyunca uygulanan basamakların ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir.

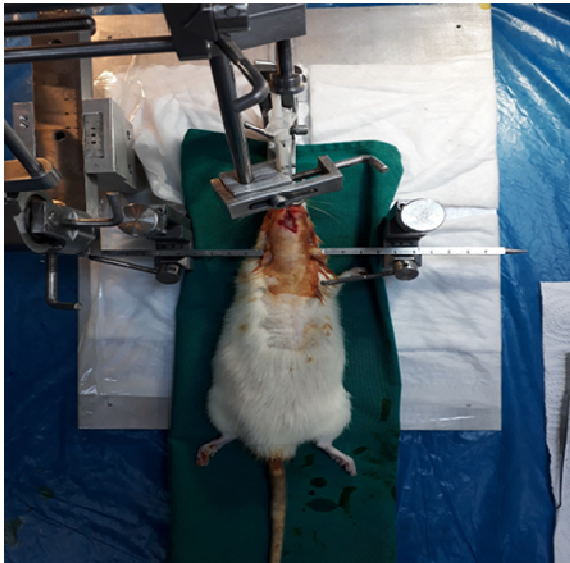
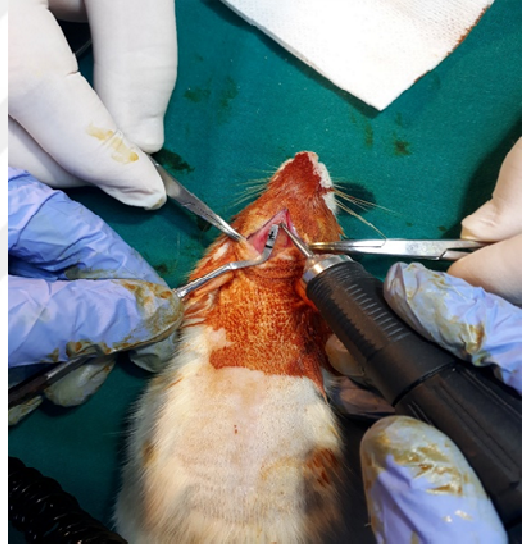
### 3.6.1. Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması

Çalışmamızda, SAK ve SAK+PST gruplarında bulunan toplam 18 hayvanda SAK modeli oluşturuldu. Anesteziden sonra hayvanların operasyon bölgesi olan kafataslarının ön bölgeleri traş edildi ve bölgenin asepsisi sağlandı. Kuyruk vertikal insizyon ile açıldı ve kuyruktan 120 µl arteriyel kan alındı. Frontal bölgeden vertikal insizyon ile deri ve kaslar açılarak bregma kemik bileşkesine ulaşıldı. Stereotaksi cihazı kullanılarak iğne sagittal düzlemin 2 mm sağına 30 derece yatırıldı ve 1.5 mm çapındaki burr deliği ile orta hatta bregmanın 7 mm önüne yerleştirildi. 120 µl heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan, 30G'lik bir iğne ile prekiiazmatik sisternaya 10 saniyede enjekte edildi. SHAM grubu için 30G iğne ucu ile prekiiazmatik sisternaya ulaşıldı ve iğne çıkarılmadan önce 10 saniye bekletildi. Yara bölgesi dikildi ve kapatıldı.

SAK operasyonu basamaklarını gösteren resimler Resim 1a ve 1b'de sunulmuştur (Resim 1a, 1b).



Resim 1a. Subaraknoid kanama modeli basamaklarını gösteren resimler.



Resim 1b. Subaraknoid kanama modeli basamaklarını gösteren resimler.



### 3.6.2. Nörodavranışsal Değerlendirme

Nörolojik skor, Garcia puanlama sistemi kullanılarak SAK'tan 24 saat önce ve sonra hangi sıçanın hangi deney grubunda olduğunu bilmeyen iki gözlemci tarafından değerlendirildi (Garcia vd., 1995). Her gruptaki sıçanların nörolojik fonksiyonlarını ölçmek için, 0-3 veya 1-3 olarak puanlanan ve toplam puanları 3 ila 18 arasında değişen altı test uygulandı. Bu testler ile sıçanlarda:

- egzersizin fonksiyonel incelemesi,
- koordinasyon,
- fiziksel aktivite ve somatik duyarlılık değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmede daha düşük bir puan, nörolojik disfonksiyonun daha şiddetli olduğunu gösterir.

### 3.6.3. Ötenazi ve Örneklerin Alınması

Çalışmanın sonunda genel anestezi altında hayvanların yaşamına servikal omur dislokasyonu ile son verildi ve beyinleri çıkarıldı. Alınan total beyin dokusundan hipokampus elde edildi. İşlemler hızlı bir şekilde ve soğuk bir tabaka üzerinde Stemi 305 Zeiss model mikroskop altında yapıldı. Her grupta bulunan 9 hayvandan 6'sı genetik ve histopatolojik değerlendirme için kullanılırken kalan 3 sıçan ise beyin ödemi açısından incelendi. Sağ hipokampus genetik analizlere kadar -80 °C'de saklanırken sol hipokampus ise histopatolojik analiz için % 4 paraformaldehit ile sabitlendi.

### 3.7. Beyin Ödemi Tespiti

Beyin ödemi tespiti için alınan beyin dokularının hızlı bir şekilde ıslak ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra doku parçaları +70 °C'de 72 saat süre ile etüvde tutuldu. Yetmiş iki saat sonunda doku parçaları etüvden çıkarıldı ve kuru ağırlıkları ölçüldü. Islak ve kuru ağırlık oranı % olarak aşağıdaki formül ile belirlendi (Ding vd., 2015).

$$[(\text{Islak Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Islak Ağırlık}] \times \%100$$

### 3.8. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme için alınan hipokampus örnekleri ilk olarak % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminin ardından doku örnekleri kasetlere konularak musluk suyu altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (% 60, % 70, % 80, % 90, % 96 ve % 100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine yayıldı. Hazırlanan doku örnekleri H-E ile boyandı. Kesitler, ödem ve piknoz parametreleri açısından Olympus CX43 model LED floresan ataçmanlı mikroskop altında (x100) aşağıda verilen kriterlere göre skorlandı (Tablo 2).

Tablo 2.

H-E boyama verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan skorlama kriterleri.

Derece 0	Yok
Derece 1	Hafif
Derece 2	Orta
Derece 3	Şiddetli
Derece 4	En ciddi

#### 3.8.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Çalışma gruplarından alınan hipokampus kesitleri; 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 60 dakika bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 90 ve % 70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris hematoksilende 2 dakika boyandı ve 2x2

dakika akar suda yıkandı. Kesitler % 1 amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 2 dakika eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (% 70, % 80, % 96 ve % 100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

### **3.8.2. Kristal Viyole Boyama Prosedürü**

Sıçanlardan alınan hipokampus doku kesitleri 60 °C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 90 ve % 70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, kristal viyole (Abcam ab246816) ile 2 dakika boyandı ve tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Ardından % 100 N-Butanol alkolde 2x1 dakika bekletilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

### **3.8.3 TUNEL Boyama Prosedürü**

Parafin bloklarından lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (% 100, % 96, % 80, % 70) edildi. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er dakika distile sudan geçirildi. Proteinaz K enzim (37 derece etüv içinde) 15 dk uygulandı. Beş dakika % 3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve ardından fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Üç dk Equilibration Buffer ile muamele edildi. TdT enzim çalışma solüsyonunda, 37 °C'ye ayarlanmış etüv içinde 60 dk bekletildi. Working Stop/Wash buffer solüsyonunda 10 dakika yıkandı. Digoxigenin peroksidaz ile 30 dakika muamele edildi ve PBS ile yıkandı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB kromojen ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dakika süreyle Vector Methyl Green (H-3402-500) uygulandı. Distile su ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (% 70, % 80, % 96 ve % 100) 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

### **3.9. Genetik Analizler**

Genetik analizler hipokampus doku örneklerinde gerçekleştirildi. Ötanazi sonrası hızlıca alınan doku örnekleri işlem yapılincaya kadar -80 °C’de bekletildi ve saklanan dokular çıkarıldıktan sonra buz aküsü üzerine konularak hazırlıklar gerçekleştirildi. Analizler 3 basamakta tamamlandı. İlk aşamada total RNA izolasyonu, ikinci aşamada cDNA eldesi, son aşamada ise Real-Time PCR uygulaması yapılarak süreç sonlandırıldı.

#### **3.9.1. Total RNA İzolasyonu**

Hipokampus dokusundan yaklaşık 25-30 mg alınarak 2 ml’ lik steril tüplere aktarıldı ve ependorf tüpler 10 sn sıvı azotta bekletildi. Her birine birer adet steril çelik bilye konulduktan sonra homejanizatör cihazında (Retsch MM400) dokular homojenize edildi. Elde edilen homejenatlardan total RNA izolasyonu için PURE Link RNA MiniKit (CatNo. 12183018A) kullanıldı. Elde edilen RNA örneklerinde konsantrasyon ve saflık tayini NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Saflık oranı 260/280 nm’de ölçüldü ve 1.8-2.1 arası değerler sonraki adımlar için kullanılabilir kabul edildi (Ovalı ve Uzun, 2015).

#### **3.9.2. cDNA Eldesi**

Total RNA izolasyonundan sonra izole edilen RNA’lar cDNA eldesi işlemine kadar -80 °C’de saklandı. İşleme başlamadan önce örneklerin RNA yoğunlukları spektrofotometrik olarak belirlendi ve tüplere aktarıldı. Kit prosedürü adımları esas alınarak cDNA eldesi yapıldı (High Capacity cDNA Revere Transcription Kit, ABD). cDNA eldesi için izlenen basamaklar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3.

cDNA sentez protokolü (Ovali ve Uzun, 2017)

<b>Bileşenler</b>	<b>Örnek Başına Hacim</b>
10 x RT Buffer	2 µl
dNTP	0,8 µl
Random Primer	2 µl
Enzim	1 µl
Su	4,2 µl
RNA	10 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Yukarıda bileşimi belirtilen karışım PCR tüplerine dağıtıldı ve belirlenen şartlar altında PCR cihazında çalışıldı (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler 96-Well PCR). Örneklerde cDNA eldesi için Tablo 4'teki prosedür izlendi.

Tablo 4.

PCR koşulları (Ovali ve Uzun, 2017)

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
25 °C	10 dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk

### 3.9.3. Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

cDNA örnekleri çoğaltıldı ve akabinde quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR, StepOnePlus™ Real-Time PCR System) çalışması için kullanıldı. TaqMan (TaqMan™

Fast Advanced Master Mix, Ampliqon, Litvanya) kullanılarak gen ekspresyon miktarları analiz edildi.

qRT-PCR yönteminde gen ifade düzeylerine bakılan TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B TLR4, p53, kaspaz-3, Bcl-2, Bax ve SIRT1 genleri için normalizasyon yapıldı. Bu amaçla  $\beta$ -actin (hamarat gen) kullanıldı. Bu çalışmada, kısmi miktarlara dayalı PCR yönteminde bulunan sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR yöntemi kullanıldı ve qRT-PCR cihazından yararlanıldı.

Tablo 5.

Real Time PCR bileşen miktarları (Ovali ve Uzun, 2017)

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
SyberGreen Master Mix	5 $\mu$ l
Forward Primer	0,75 $\mu$ l
Reverse Primer	0,75 $\mu$ l
RNAse Free Su	2,5 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
<b>Toplam</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

### 3.10. İstatiksel Analizler

Gen ekspresyonlarını değerlendirmek için öncelikle qRT-PCR yönteminden elde edilen CP (crossing points) değerleri düzenlendi. Daha sonra genetik istatistik için qRT-PCR sonuçları düzenlenmiş değerleri  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri IBM Statistics SPSS 20.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Çoklu grup karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İki çalışma grubu arasındaki karşılaştırmada ise Mann Whitney U-testi kullanıldı. İstatiksel olarak  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

### **ARAŞTIRMA BULGULARI**

Bu çalışmada, sıçanlardan SHAM, SAK ve SAK+PST olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu. Tüm çalışma grupları için her grupta 9 hayvan olmak üzere toplamda 27 adet sıçan kullanıldı. Gruplar oluşturulurken gruplar arası parametrelerin farklılığını ortadan kaldırmak amacı ile canlı ağırlıkları birbirine yakın değerlere sahip gruplar oluşturulmaya özen gösterildi. Öncelikle nörolojik fonksiyonları değerlendirmek için sıçanlara hem SAK öncesi hem de sonrasında Garcia skorlaması yapıldı. Deneysel sürecin sonunda sıçanlar ötenazi edilerek hipokampus doku örnekleri alındı ve doku örnekleri üzerinde;

- 1- Doku kurutma işlemi yapılarak ıslak/kuru doku oranı belirlendi.
- 2- Histopatolojik analizler,
- 3- Apoptoz değerlendirmesi,
- 4- TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TLR4, NF- $\kappa$ B, p53, kaspaz-3, Bcl-2 ve Bax ve SIRT1 için gen ekspresyon düzeylerini belirlemek üzere RT-PCR analizi yapıldı.

Tüm hayvanlar çalışmayı sağlıklı bir şekilde tamamladı ve araştırma sonucunu etkileyecek herhangi bir olumsuzlukla karşılaşmadı.

#### **4.1. Mortalite ve Subaraknoid Kanama Operasyonu Bulguları**

SAK modellemesi sonrası 24 saat içinde gruplarda ölen hayvana rastlanmadı. SAK gruplarında subaraknoid bölgede SAK sonrası şiddetli kanama gözlenirken, SAK+PST grubunda kanamada azalma gözlemlendi. Beynin subaraknoid boşluklarında biriken kanamanın görüntüleri Resim 2’de sunulmuştur.

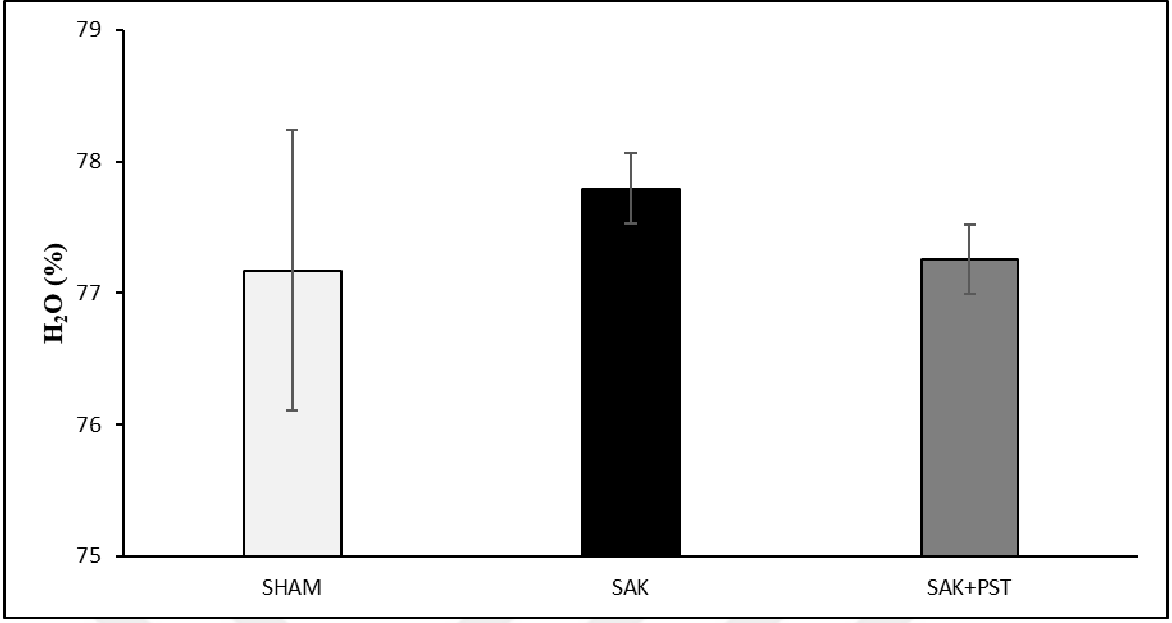


Resim 2. Tüm gruplardan 24. saatte beynin ventralinden elde edilen örnek birer görüntü. SAK ve SAK+PST gruplarında kanama odakları görülmektedir.

#### 4.2. Beyin Ödemi Tespit Bulguları

Hipokampus dokusunda uygulanan doku kurutma yöntemi ile elde edilen veriler Şekil 11'de gösterilmiştir. SAK ve SAK+PST gruplarında beyindeki ödem değerlendirildiğinde SHAM grubuna göre artış olduğu belirlendi. SHAM grubunda  $77,1 \pm 1,06$  olan değer SAK+PST grubunda  $77,2 \pm 0,27$  ile SHAM grubuna oldukça yakın gözlemlendi. Bu değer SAK grubunda  $77,7 \pm 0,26$  'ye çıkmış olmasına rağmen SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığa rastlanmadı ( $p>0,05$ ).



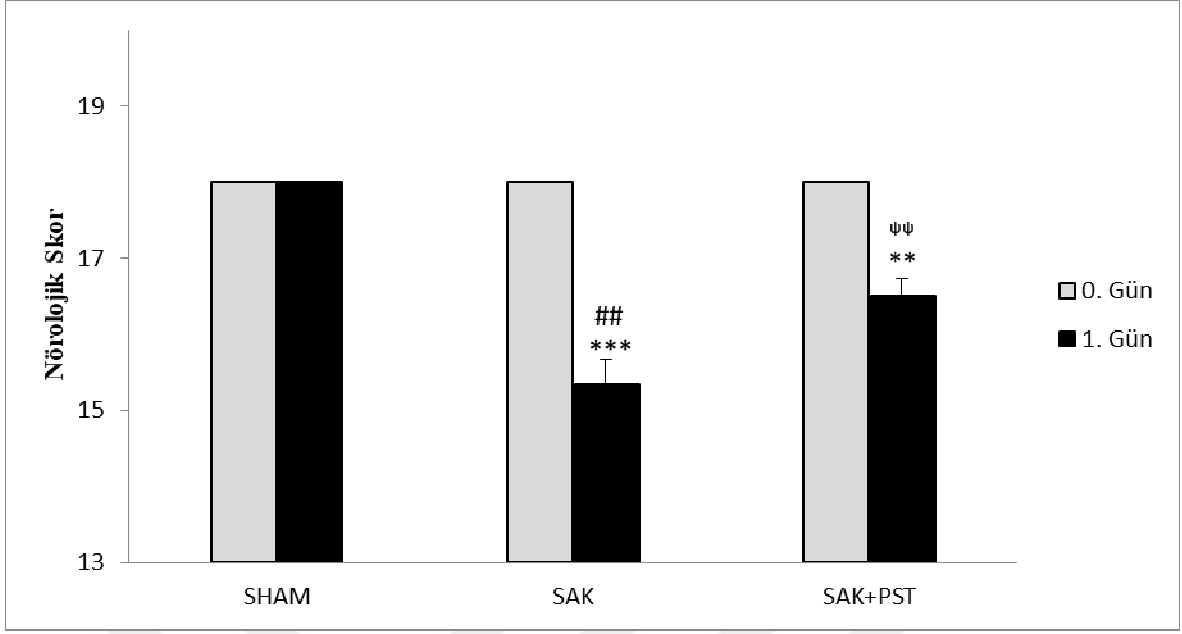


Şekil 11. Tüm gruplara ait beyin ıslak/kuru oranı verilerinin yüzde olarak gösterimi.

### 4.3. Nörodavranışsal Değerlendirme Bulguları

Garcia skorlaması kullanılarak hayvanların deney öncesi ve deney sonrası nörolojik fonksiyonları belirlendi. Deney öncesi veriler 0. Gün, deney sonrası veriler ise 1. Gün olarak kaydedildi (Şekil 12). Deney öncesi (0.Gün) yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık belirlenmedi ( $p>0,05$ ). Deney sonrası ise SHAM grubu ile SAK grubu arasında istatistiksel anlamda önemli fark bulundu ( $p<0,05$ ). Bununla beraber, SHAM ile SAK+PST grubu arasında SHAM grubu yönünde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p<0,01$ ). Ancak, SAK ile SAK+PST grupları arasında herhangi bir farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ).

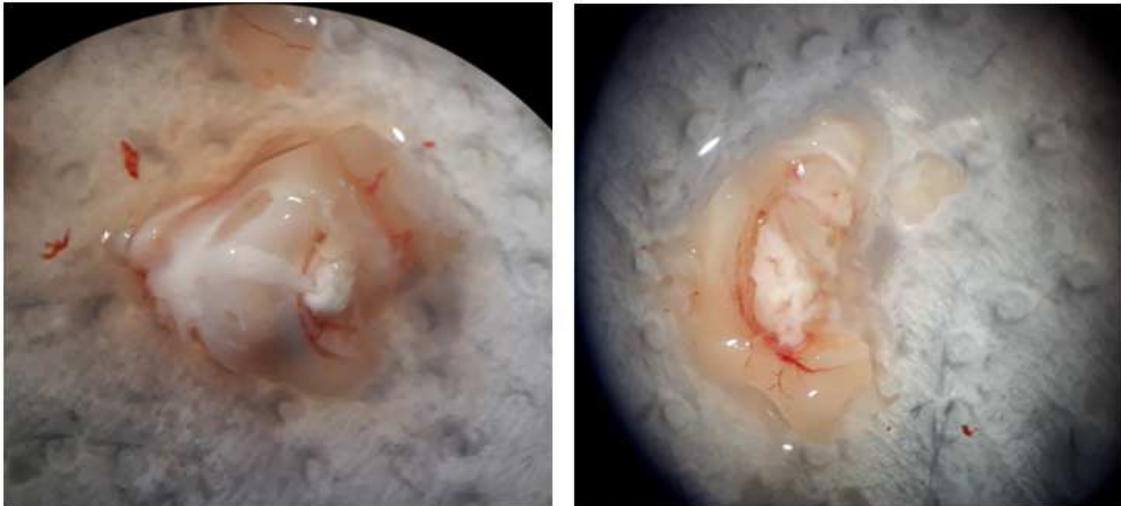
Grupların deney öncesi ile sonrası değerlendirmeleri karşılaştırıldığında ise SHAM grubunda herhangi bir farklılık belirlenmedi ( $p>0,05$ ). SAK grubunda ise 1. Gün sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu ( $p<0,01$ ). Buna ek olarak benzer sonuçlar SAK+PST grubunda da tespit edildi ( $p<0,01$ ).



Şekil 12. Çalışma gruplarının nörolojik skor bulgularının karşılaştırılması (\*\*\*: 1. Gün SHAM grubuna göre  $p < 0,001$ ; \*\*: 1. Gün SHAM grubuna göre  $p < 0,01$ ; ##: 0. Gün SAK grubuna göre  $p < 0,01$ ; ψψ: 0. Gün SAK+PST grubuna göre  $p < 0,01$ ).

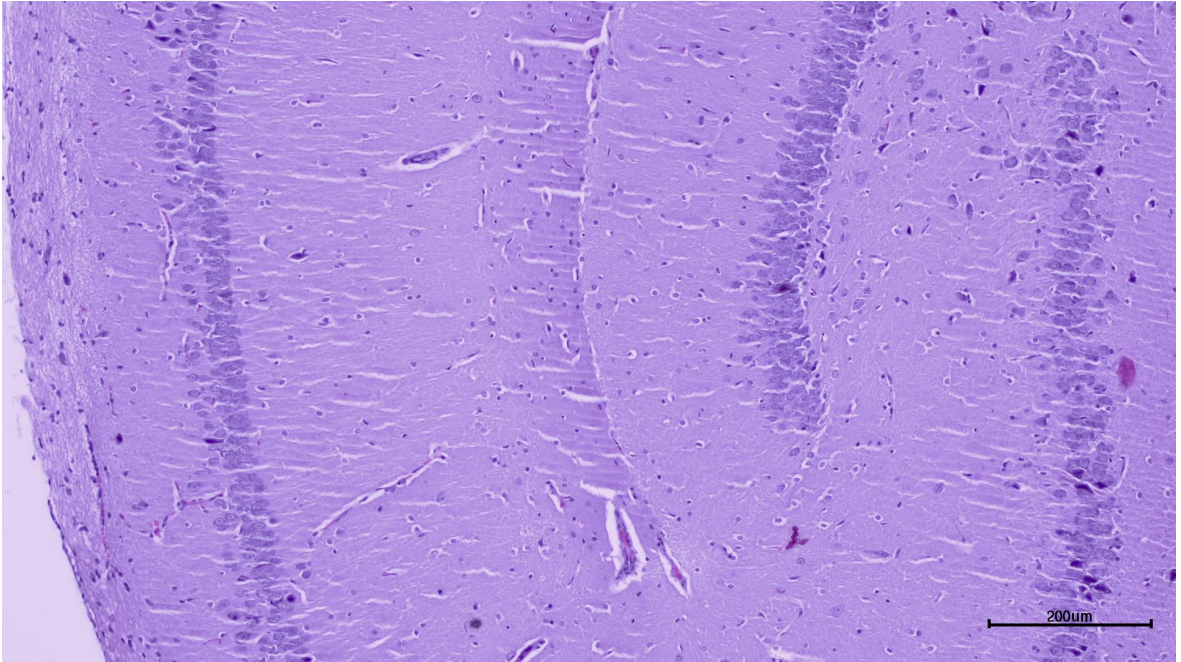
#### 4.4. Histopatolojik Bulgular

##### 4.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları

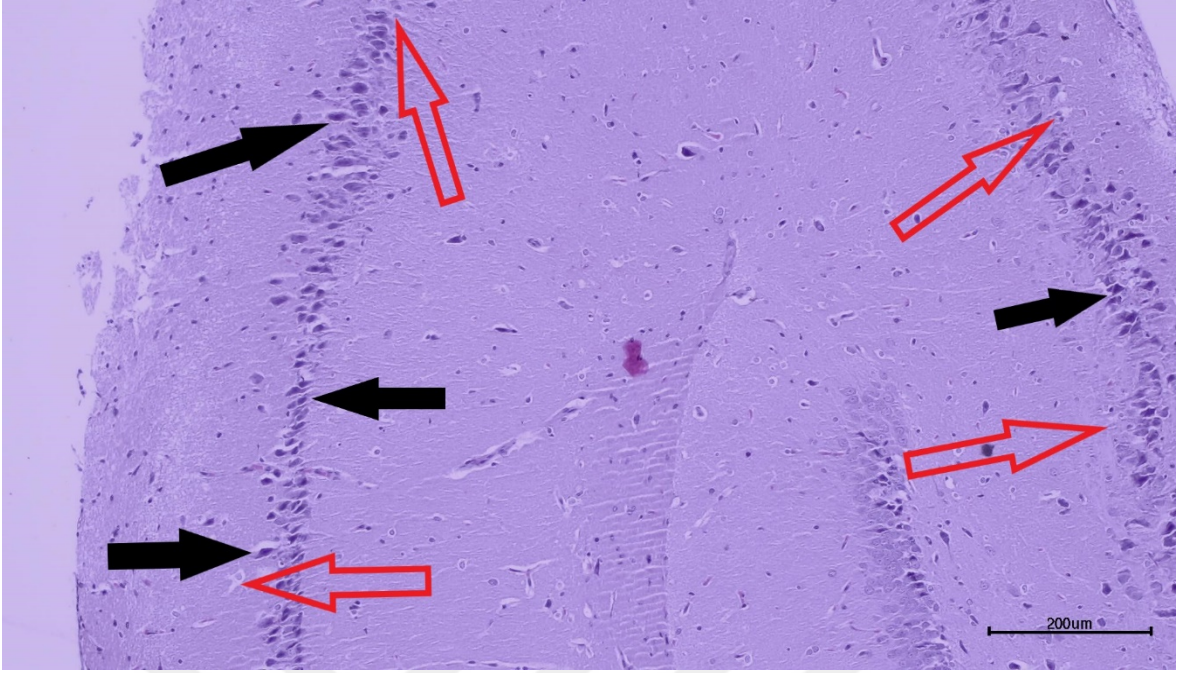


Resim 3. Hipokampus dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsüne ait bir örnek.

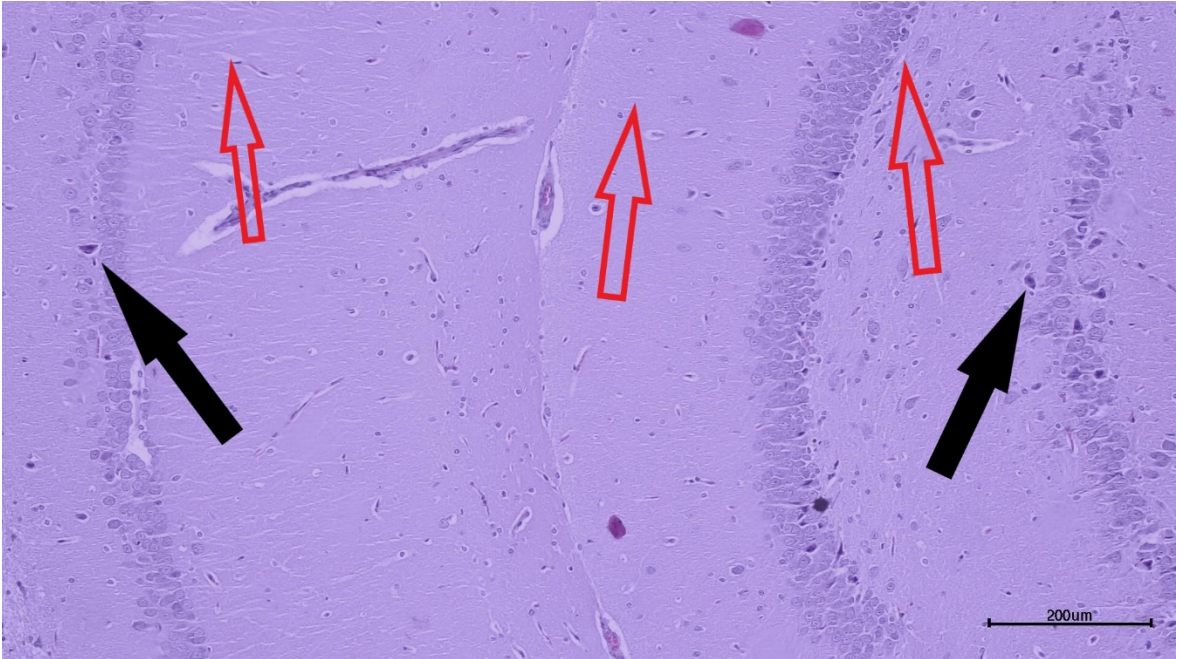
Hipokampustan alınan kesitler H-E boyama sonrasında hücrel ödem ve piknoz parametreleri açısından değerlendirildi. SHAM grubunun değerlendirme sonucunda belirgin bir hücrel ödem ve piknoz bulgusuna rastlanmadı (Şekil 16 ve 17). SHAM grubu ile SAK grubu karşılaştırıldığında ise her iki parametre açısından SAK grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (ödem için  $p<0,001$ ; piknoz için  $p<0,001$ ). Benzer şekilde, SHAM ile SAK+PST grubu karşılaştırıldığında hem ödem hem piknoz değerlendirmesinde artış belirlendi ( $p<0,001$ ;  $p<0,001$ ). SAK ile SAK+PST grubu karşılaştırıldığında ise her iki parametrede azalma görülmesine rağmen sadece piknoz parametresi açısından yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edildi ( $p<0,05$ ). Elde edilen veriler ve doku kesitlerinin görüntüleri Şekil 13, 14 ve 15 'te verilmiştir.



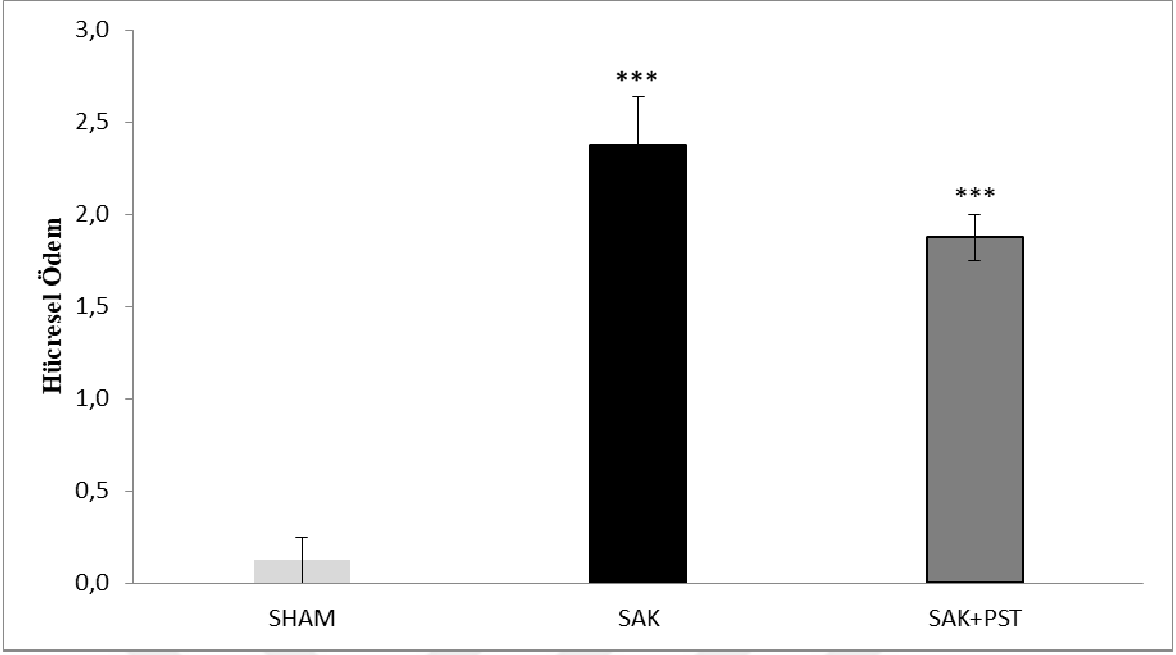
Şekil 13. SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x).



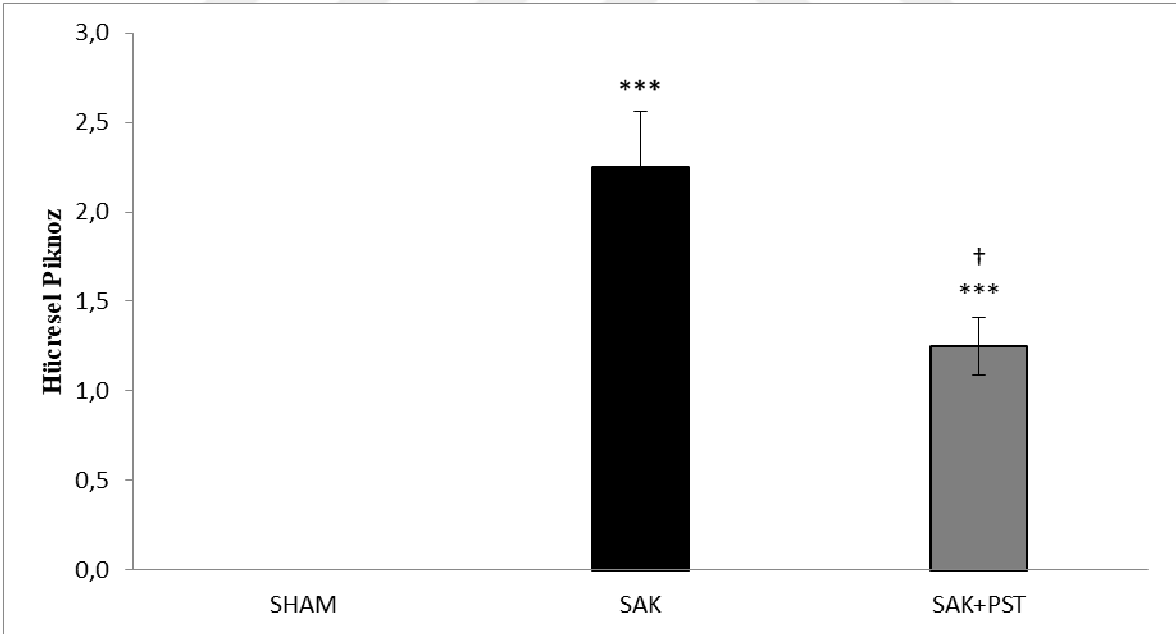
Şekil 14. SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x). Siyah oklar hücresel piknozu, kırmızı oklar ise ödem alanlarını göstermektedir.



Şekil 15. SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (H-E, 100x). Siyah oklar hücresel piknozu, kırmızı oklar ise ödem alanlarını göstermektedir.



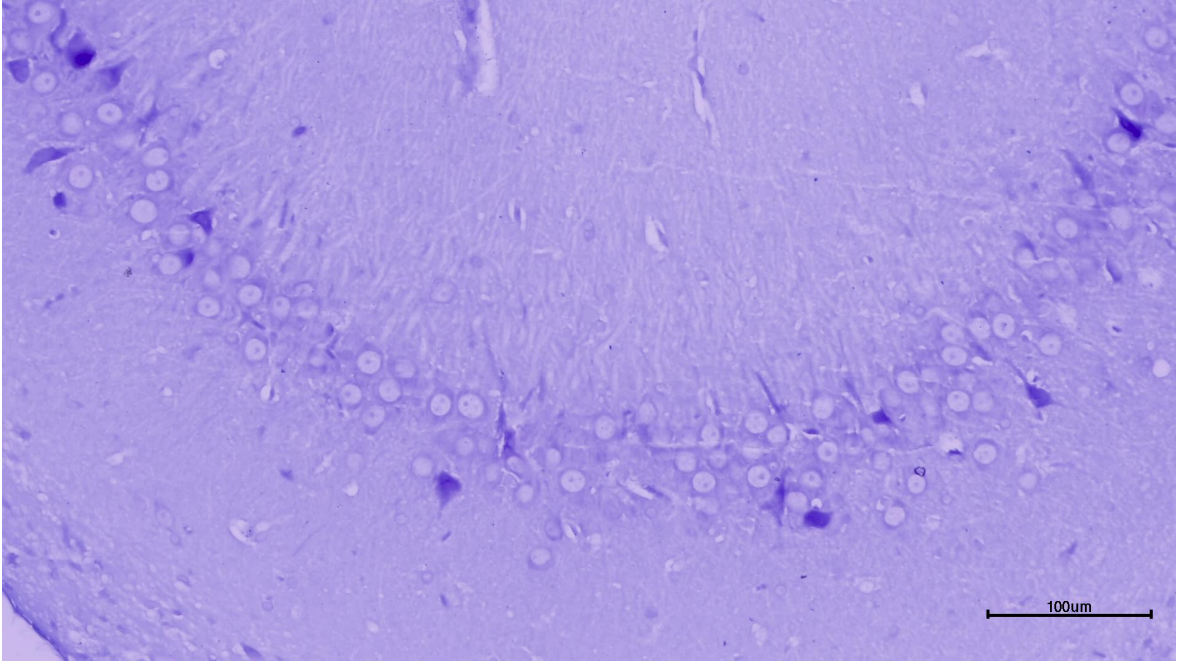
Şekil 16. Çalışma gruplarından elde edilen H-E boyalı histolojik kesitlerde hücresel ödem kriterine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması (\*\*\*: SHAM grubuna göre  $p < 0,001$ ).



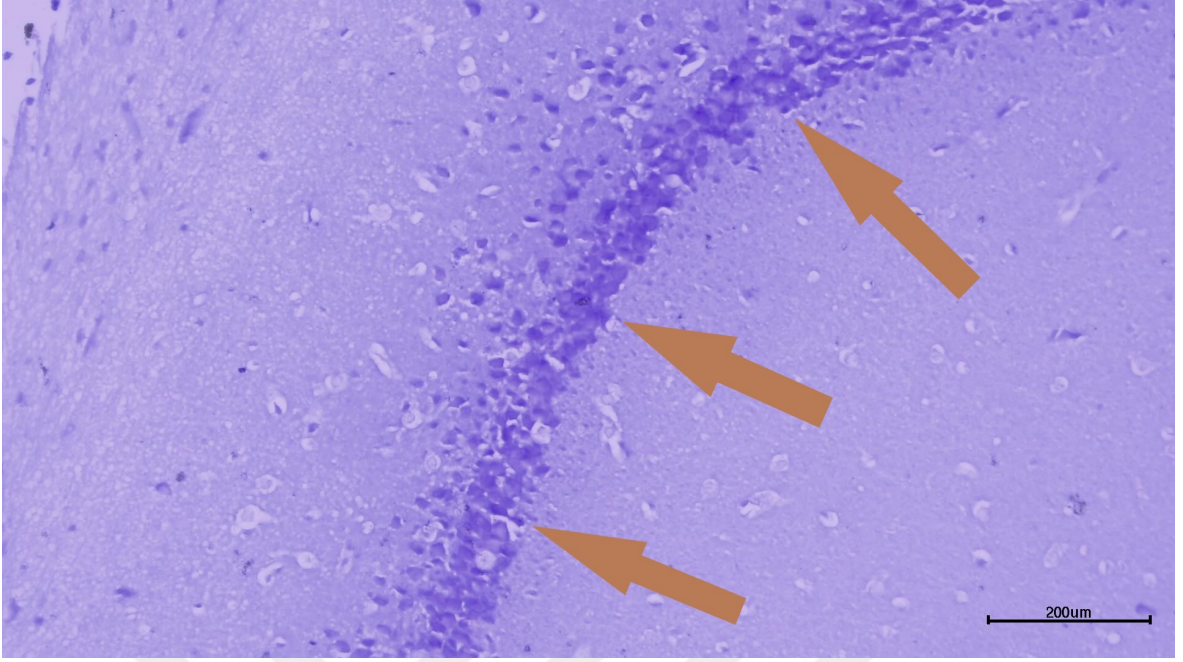
Şekil 17. Çalışma gruplarından elde edilen H-E boyalı histolojik kesitlerde hücresel piknoz kriterine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması (\*\*\*: SHAM grubuna göre  $p < 0,001$ ; †: SAK grubuna göre  $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2. Kristal Viyole Boyama Bulguları

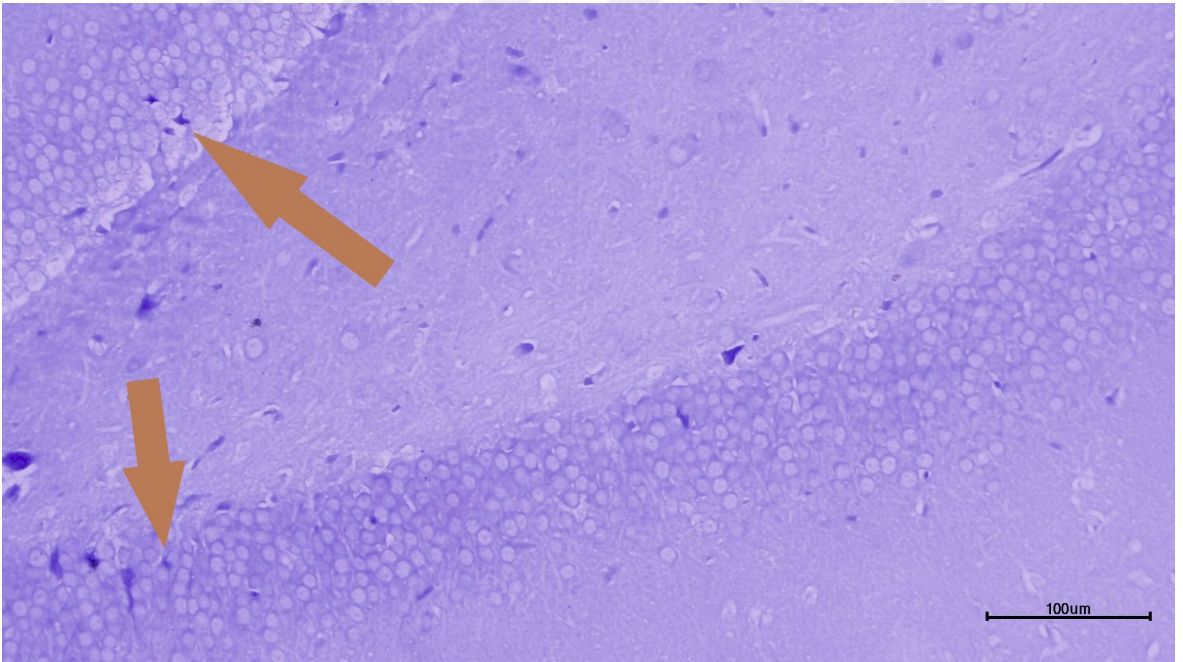
Kristal viyole boyama sonuçlarına göre SHAM ile SAK ve SAK+PST grupları karşılaştırıldığında her iki grupta da hasarlı hücre sayısında SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ). SAK ve SAK+PST grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise SAK+PST grubunun verilerinde anlamlı bir azalış tespit edildi ( $p<0,05$ ; Şekil 21).



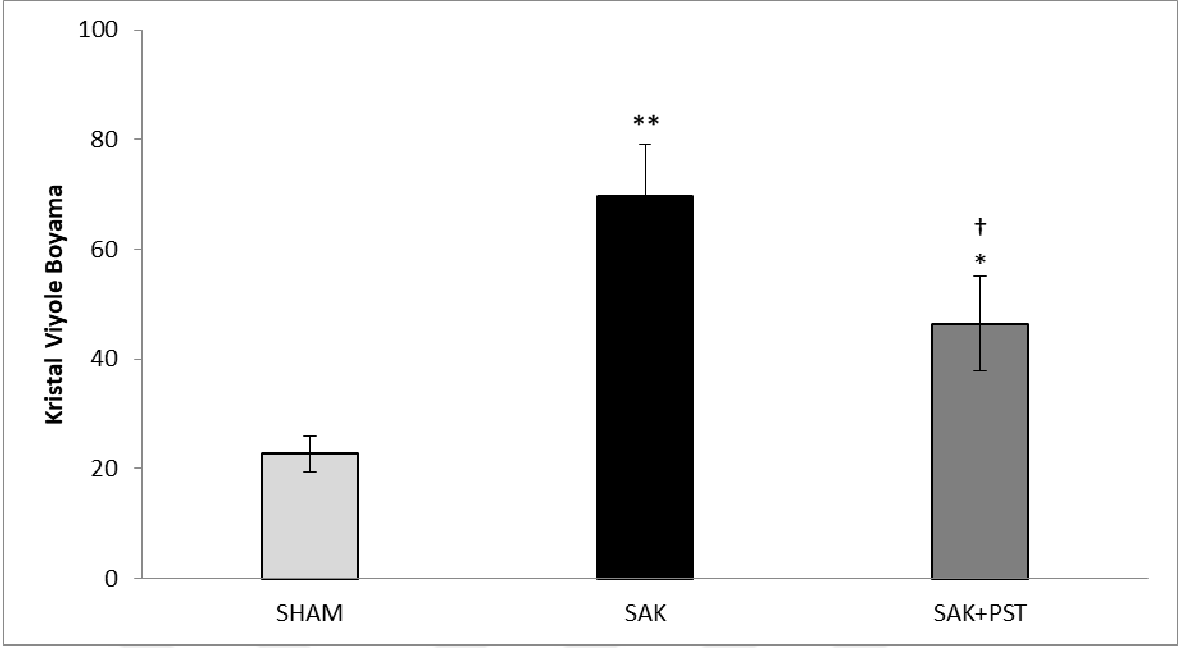
Şekil 18. SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).



Şekil 19. SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).  
Kahverengi oklar hasarlı hücreleri göstermektedir.



Şekil 20. SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).  
Kahverengi oklar hasarlı hücreleri göstermektedir.

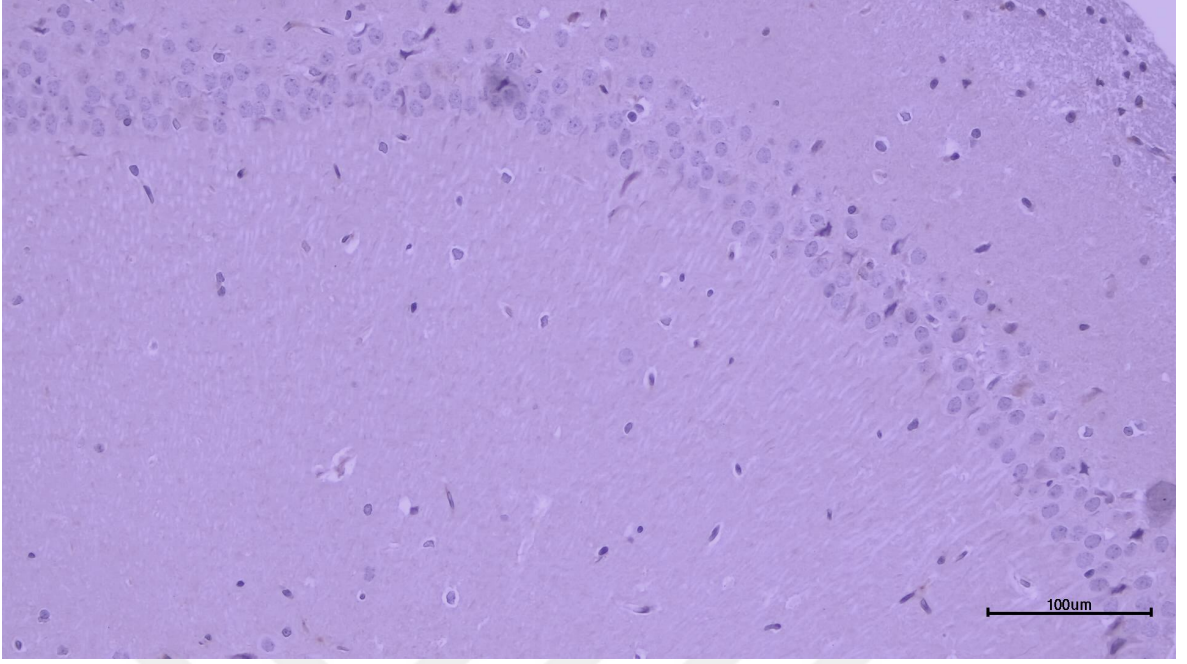


Şekil 21. Çalışma gruplarına ait Kristal Viyole boyalı histolojik kesitlerden elde edilen değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması (\*\*: SHAM grubuna göre  $p < 0,01$ ; \*: SHAM grubuna göre  $p < 0,05$ ; †: SAK grubuna göre  $p < 0,05$ ).

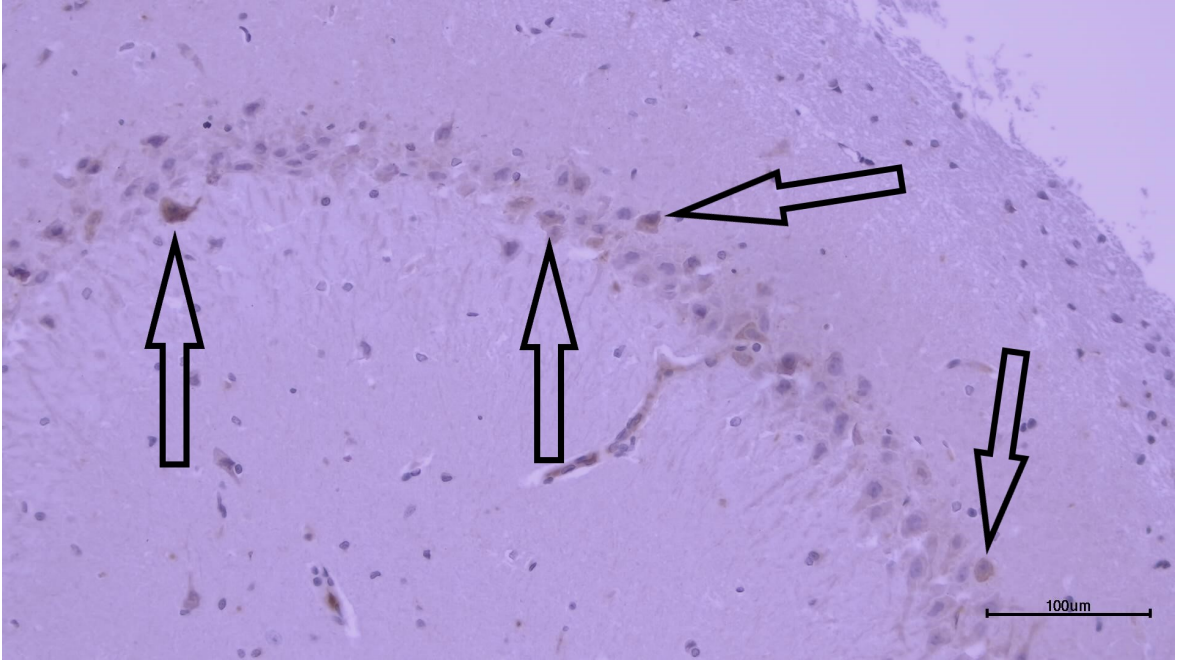
#### 4.4.3. TUNEL Boyama Bulguları

Apoptotik hücre tayini için TUNEL boyama yapıldı. Yapılan skorlamaya göre SHAM ile SAK grubu karşılaştırılmasında SAK grubu yönünde anlamlı bir artış belirlendi ( $p < 0,01$ ). Benzer bir istatistiksel anlamlılık SHAM ile SAK+PST grupları arasında da mevcuttu ( $p < 0,05$ ). SAK ile SAK+PST grupları arasındaki karşılaştırmada ise SAK+PST grubu yönünde anlamlı azalış vardı ( $p < 0,01$ ; Şekil 25).

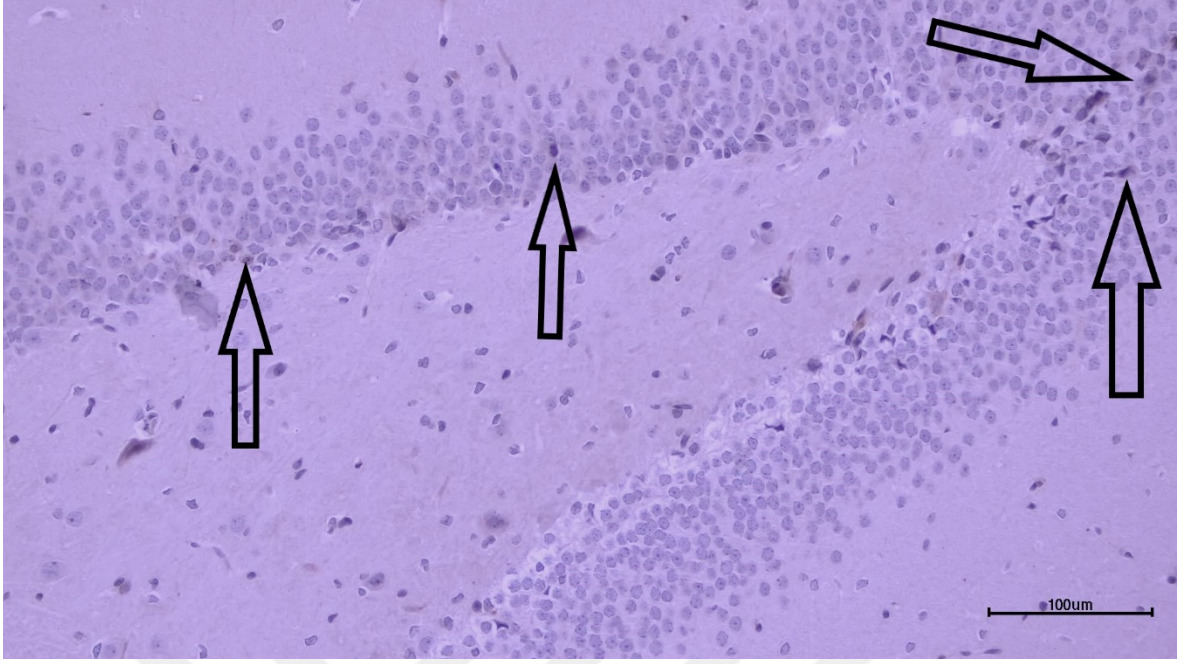




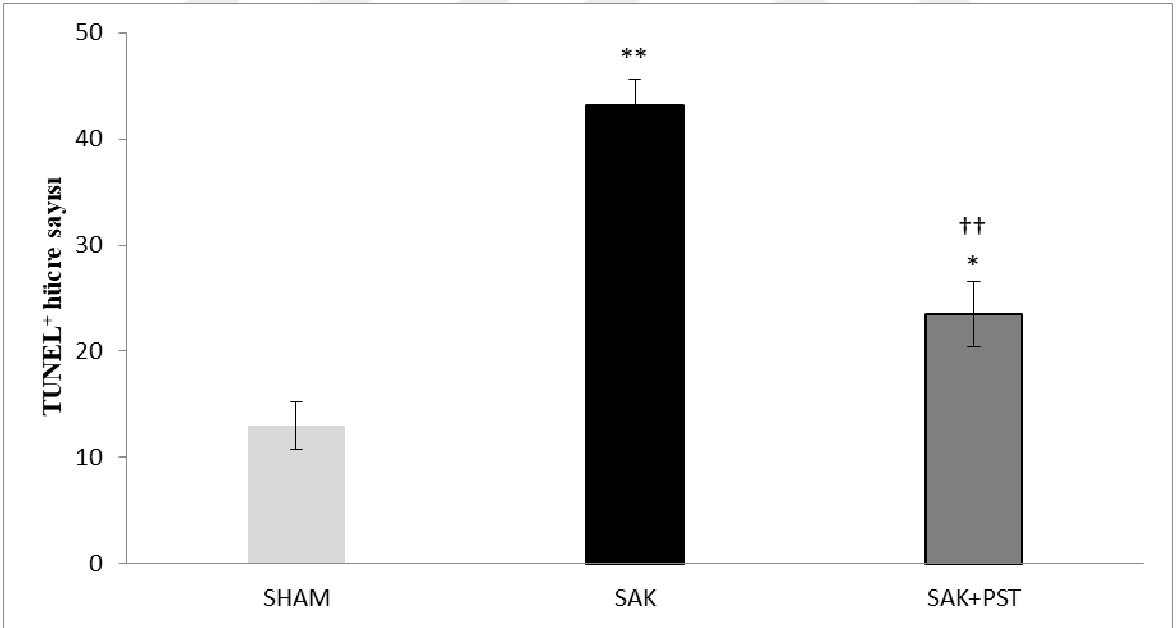
Şekil 22. SHAM grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x).



Şekil 23. SAK grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x). Siyah oklar TUNEL (+) başka bir ifadeyle apoptoza giden hücreleri göstermektedir.



Şekil 24. SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x). Siyah oklar TUNEL (+) başka bir ifadeyle apoptoza giden hücreleri göstermektedir.

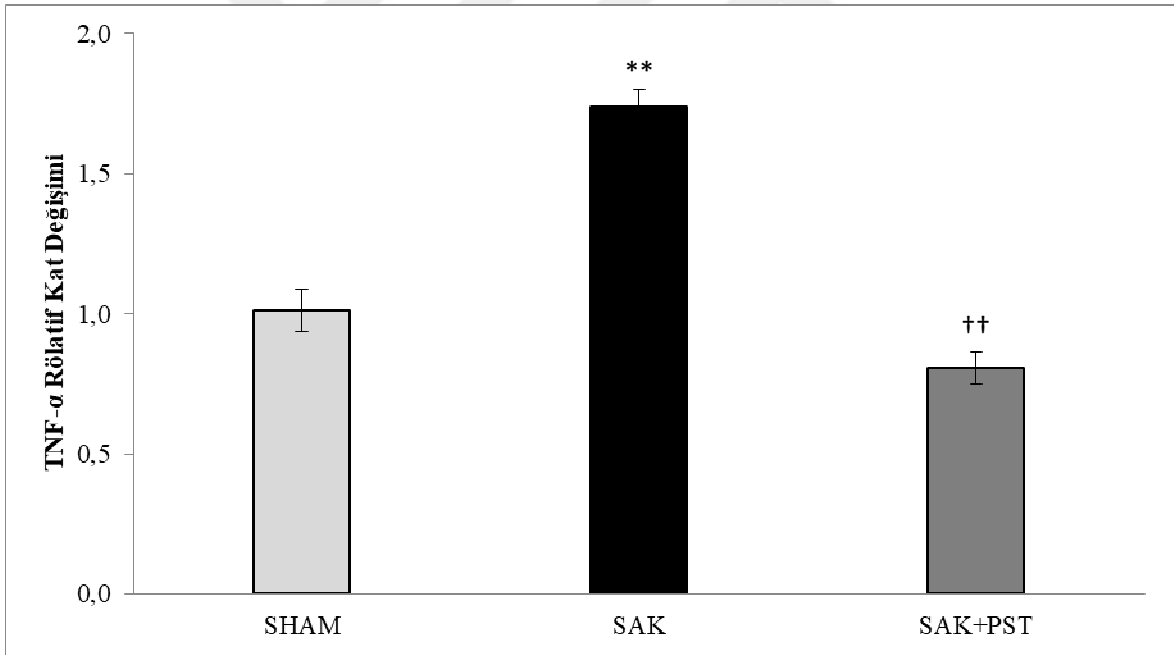


Şekil 25. Deney gruplarında TUNEL<sup>+</sup> hücre sayılarının karşılaştırılması (\*\*: SHAM grubuna göre p<0,01; \*: SHAM grubuna göre p<0,05; ††: SAK grubuna göre p<0,01).

## 4.5. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

### 4.5.1. TNF- $\alpha$ Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

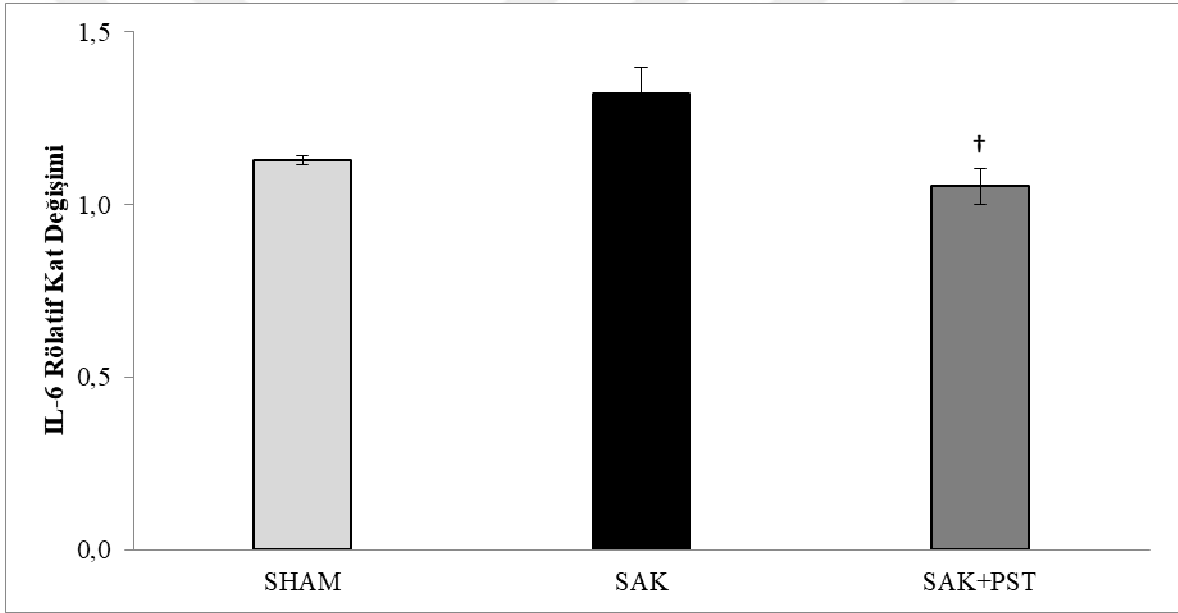
Gruplardan elde edilen TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon değerlerinin normalize edilmiş hali Şekil 26'da gösterilmiştir. Bu veriler açısından SHAM ile SAK grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulundu ( $p < 0,01$ ). Yapılan analizlerde SAK+PST grubu değerleri SHAM grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen TNF- $\alpha$  düzeylerindeki azalış dikkat çekti ( $p > 0,05$ ). Buna ek olarak SAK+PST grubunda SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p < 0,01$ ).



Şekil 26. TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (\*\*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,01$  ; ††: SAK grubuna göre,  $p < 0,01$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.2. IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

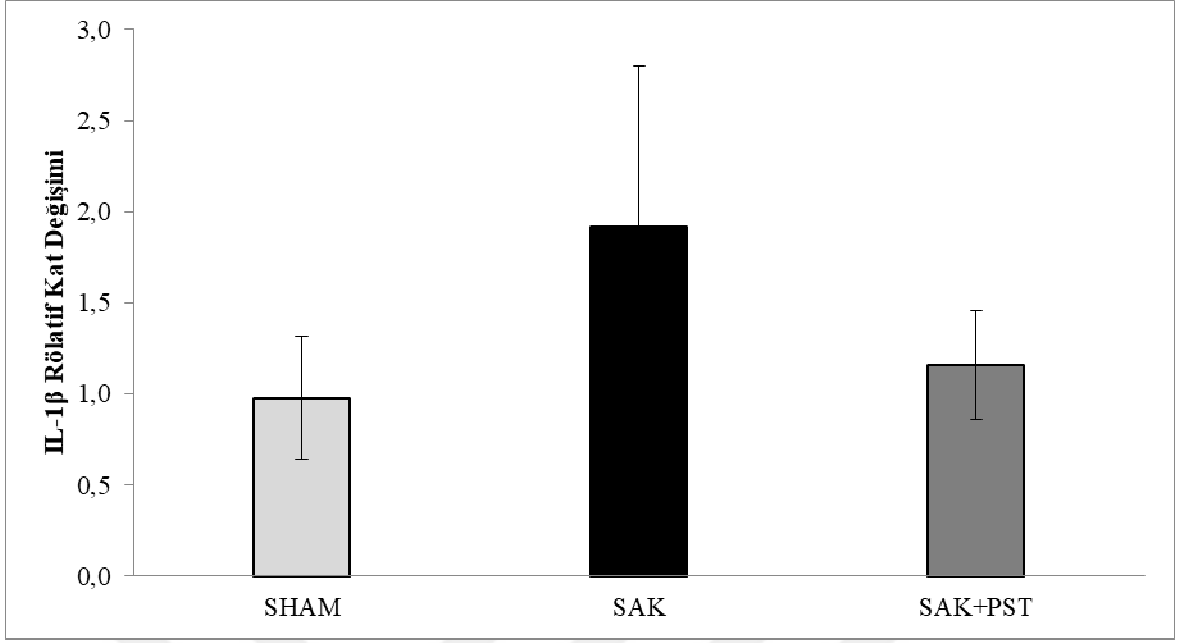
IL-6 mRNA değerlerinin normalize edilmiş sonuçları incelendiğinde SHAM ile SAK grubu arasında SAK grubu yönünde bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi ( $p>0,05$ ). Bununla birlikte SHAM ile SAK+PST grupları arasında da istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamadı ( $p>0,05$ ). Öte yandan SAK ile SAK+PST grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise SAK+PST grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu ( $p<0,05$ ; Şekil 27).



Şekil 27. IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (†: SAK grubuna göre,  $p<0,05$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.3. IL-1 $\beta$ Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

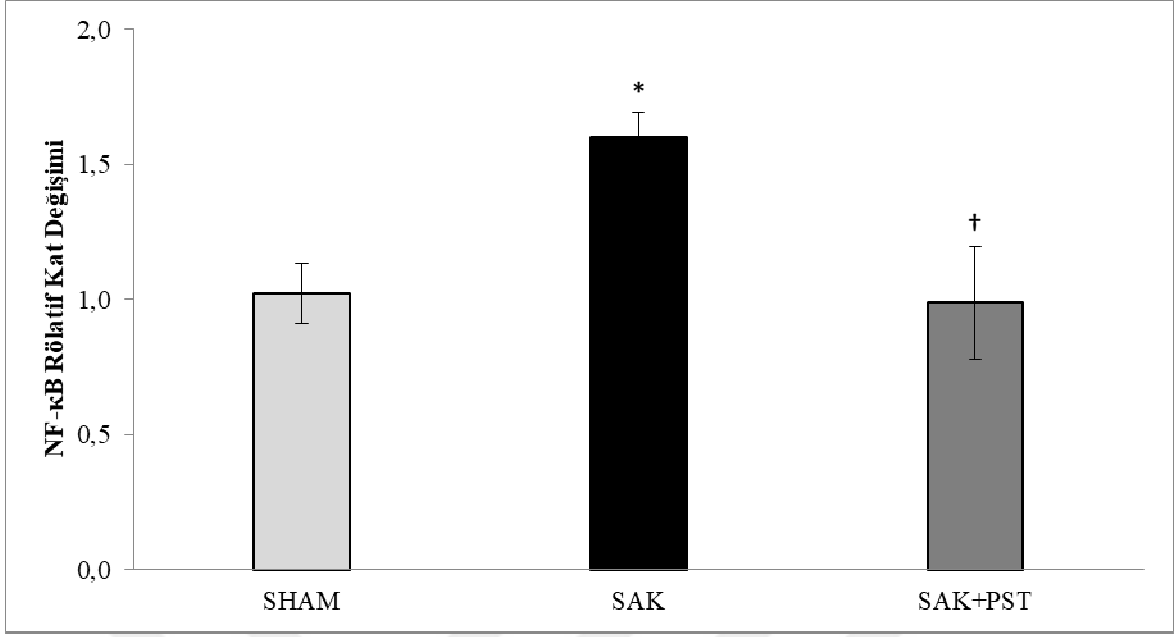
SAK grubunda SHAM ve SAK+PST gruplarına göre IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyi en yüksek değerinde gözlemlendi. Ancak SHAM, SAK ve SAK+PST grupları arasındaki IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ). IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyleri için elde edilen veriler Şekil 28'de verilmiştir.



Şekil 28. IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.4. NF- $\kappa$ B Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

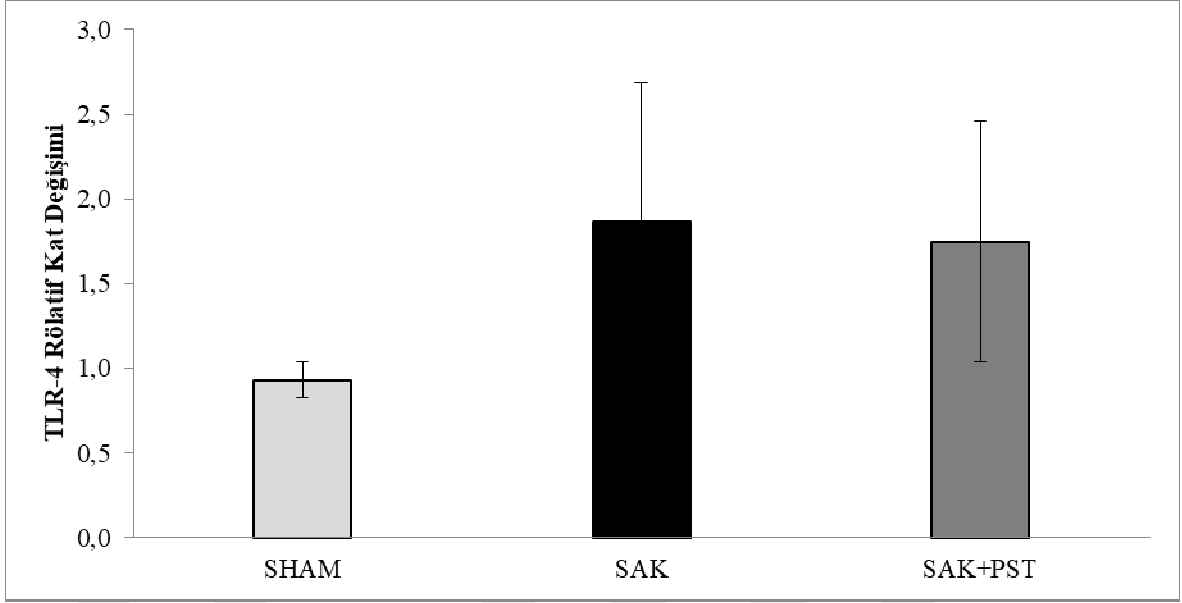
NF- $\kappa$ B'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin normalize edilmiş seviyeleri karşılaştırıldığında SHAM ile SAK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu anlaşıldı ( $p < 0,05$ ). Öte yandan SHAM ile SAK+PST karşılaştırılmasında herhangi bir anlamlılık mevcut değildi ( $p > 0,05$ ). Bununla beraber SAK ile SAK+PST grupları incelendiğinde SAK+PST grubunda SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). NF- $\kappa$ B ekspresyon düzeyleri için elde edilen veriler Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 29. NF-κB gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (\*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,05$ ; †: SAK grubuna göre,  $p < 0,05$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.5. TLR4 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

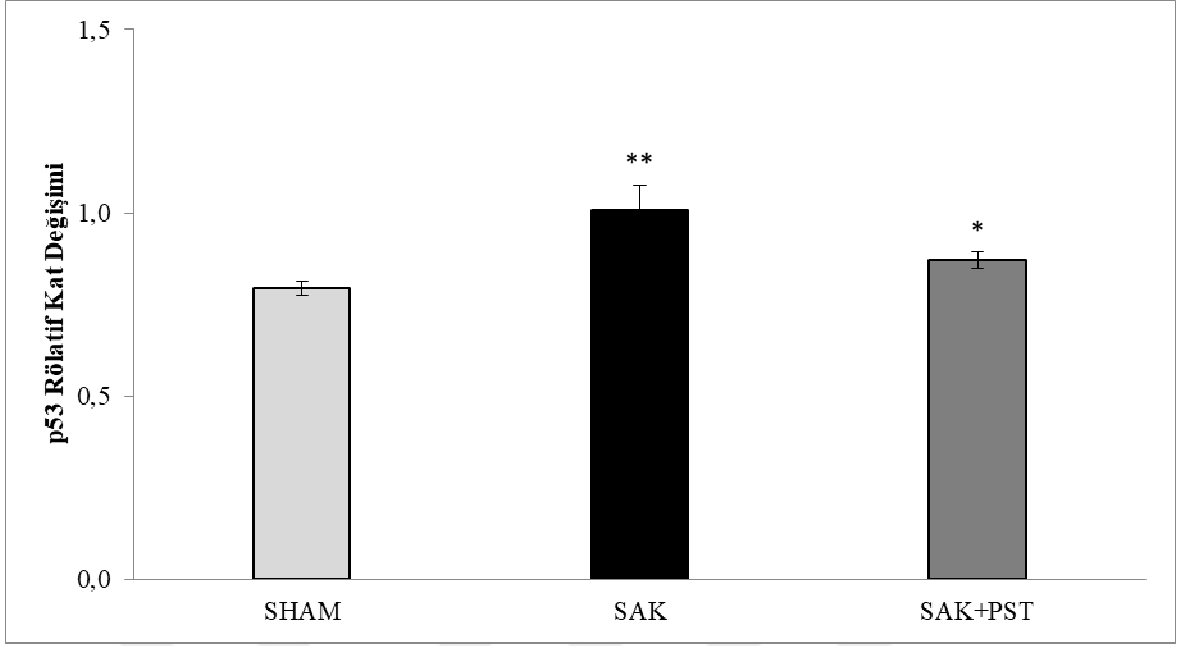
TLR4'ün gruplar arası değişimleri incelendiğinde SAK grubu en yüksek değeri göstermesine rağmen gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ; Şekil 30).



Şekil 30. TLR4 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.6. p53 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Ekspresyon seviyeleri incelenen p53 geninde SHAM ile SAK ve SAK+PST grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (sırasıyla  $p < 0,01$  ve  $p < 0,05$ ). SAK ile SAK+PST grubu karşılaştırıldığında ise SAK+PST grubu değerlerinde bir azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmedi ( $p > 0,05$ ; Şekil 31).

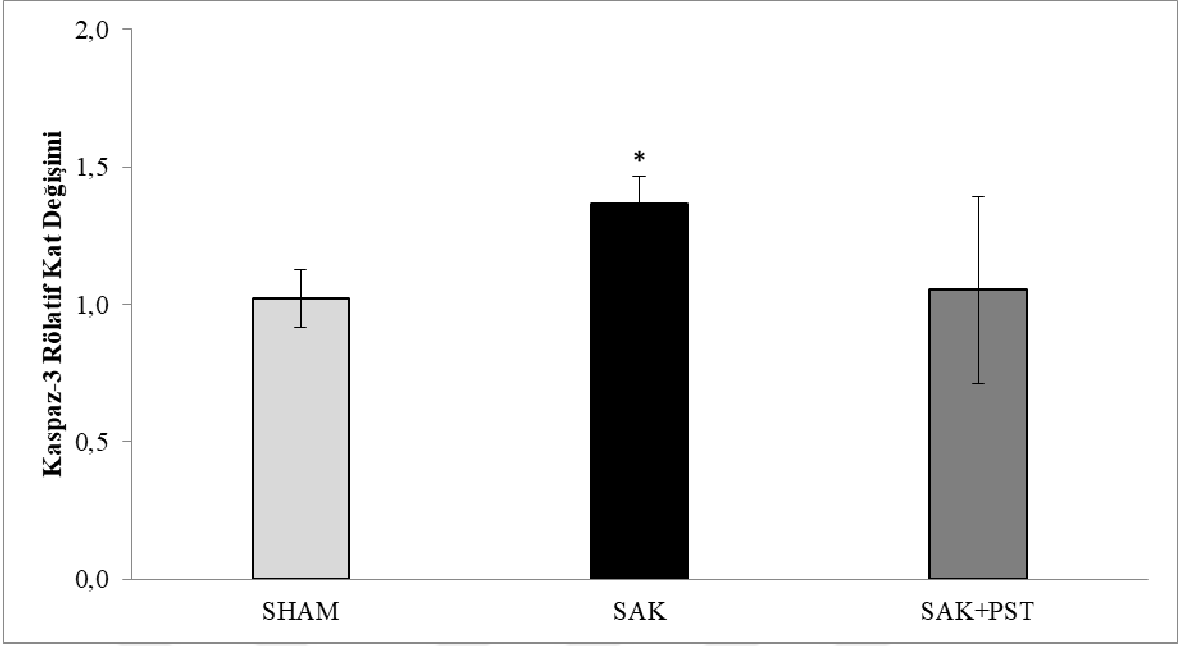


Şekil 31. p53 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (\*\*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,01$ ; \*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,05$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.7. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

RT-PCR değerlendirmesi sonucunda, apoptotik bir belirteç olan kaspaz-3 gen ekspresyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı değişimlere rastlandı. SHAM grubu verileri SAK ve SAK+PST grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık sadece SHAM ile SAK grupları arasında belirlendi ( $p < 0,05$ ). SAK ile SAK+PSK grupları arasındaki incelemede ise istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı ( $p > 0,05$ ) (Şekil 32).

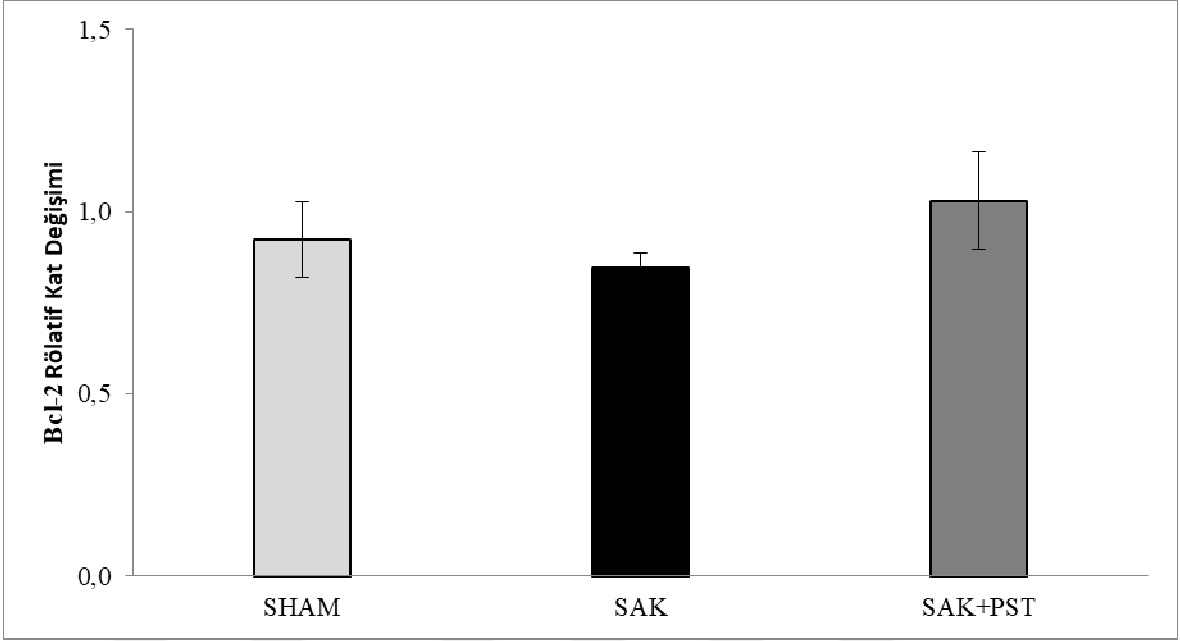




Şekil 32. Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (\*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,05$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.8. Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

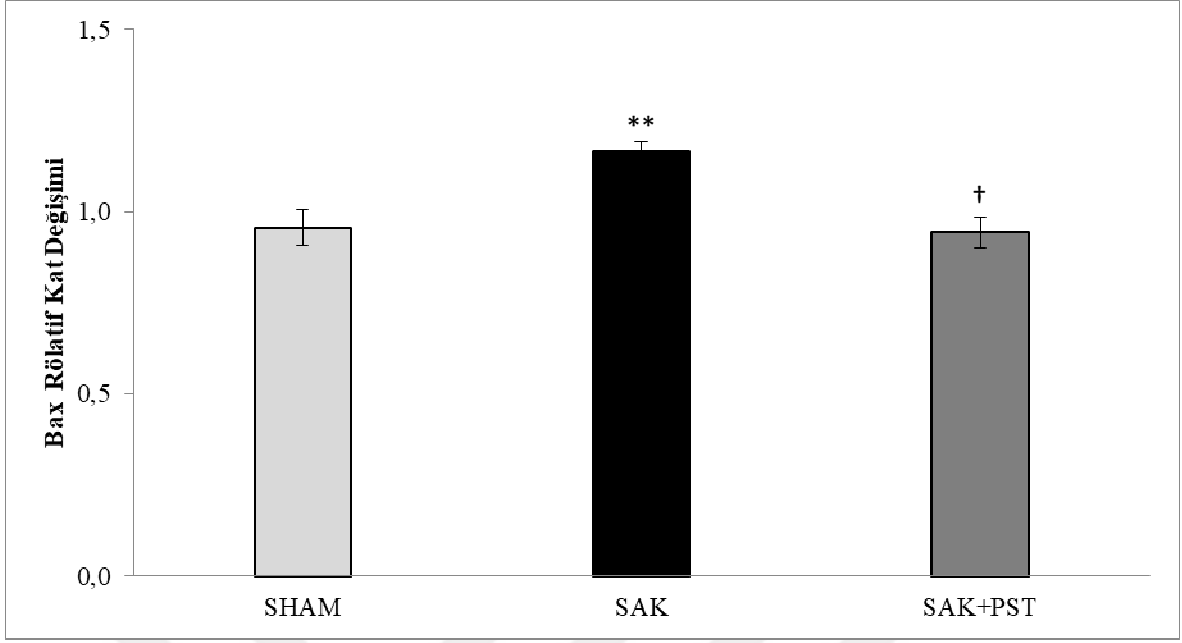
Çalışma grupları arasındaki Bcl-2 gen ekspresyon analiz sonuçları incelendiğinde, gruplar arasında farklılıklar meydana gelmesine rağmen istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılığa rastlanmadı ( $p > 0,05$ , Şekil 33).



Şekil 33. Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.9. Bax Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

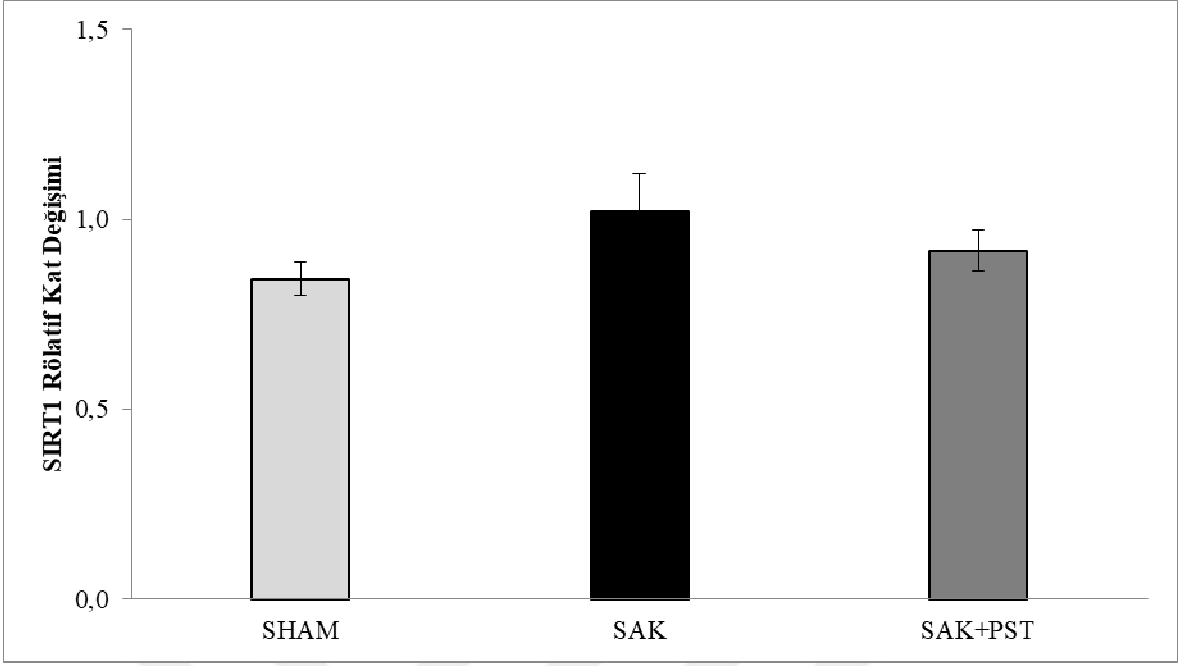
Bax'ın gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel farklar bulundu. SHAM ile SAK grupları arasında yapılan değerlendirmede SAK grubunda, SHAM grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış mevcuttu ( $p < 0,01$ ). SHAM grubu ile SAK+PST grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). Buna ek olarak SAK+PST grubunda SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p < 0,05$ ; Şekil 34).



Şekil 34. Bax gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (\*\*: SHAM grubuna göre,  $p < 0,01$ ; †: SAK grubuna göre,  $p < 0,05$ ; y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

#### 4.5.10. SIRT1 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

SIRT1 rölatif mRNA ekspresyonları değerlendirmesinde gruplar arasında farklılıklar gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık belirlenmedi ( $p > 0,05$ ; Şekil 35).



şekil 35. SIRT1 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması (y ekseninde bulunan değerler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiş  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleridir).

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 5.1. Tartışma

Bu çalışmada, deneysel SAK modeli oluşturulan sıçanlarda hipokampus dokusunda meydana gelen patolojik değişikliklere karşı PST'nin tedavi edici etkileri ilk kez araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PST uygulamasının hipokampus dokusunda:

- a) Histopatolojik düzeyde;
  - Hücrel ödemi ve piknozu azalttığı,
  - Hasarlı hücre sayısını azaltarak canlı nöron sayısını artırdığı,
  - Apoptotik hücre skorunu düşürdüğü,
- b) Moleküler düzeyde;
  - TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, p53, kaspaz-3 ve Bax gen ekspresyon seviyelerini azalttığı belirlenmiştir.

Bu sonuçlar PST'nin SAK sonrası ortaya çıkan hipokampus hasarında klasik tedavi yöntemlerine ilave olarak kullanılacak bir molekül olduğunu göstermektedir.

Beyin dokusunda kanamalara bağlı inmeler intraserebroventriküler kanamalar veya SAK olmak üzere başlıca iki yolla olmaktadır. Her iki kanama da yüksek morbitide ve mortalite ile seyretmektedir. Hayvanlarda oluşturulan SAK modellemesi, insanlarda subaraknoid kanamaları modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Beyin dokusunda kanama modeli oluşturmak için genelde sisterna magnaya kan enjeksiyonu uygulaması yapılmaktadır (Chang vd., 2015; Wu vd., 2017). Başka bir yöntem ise intrakraniyal bir damarın delinmesi ile gerçekleştirilir (Mo vd., 2019; Xie vd., 2018). Çalışmamızda ise bu iki yöntemden farklı olarak Prunell vd.'nin geliştirdiği SAK modeli uygulanmıştır (Prunell vd., 2002). Bu yöntem insanlarda görülen klinik SAK'ı en iyi yansıtan yöntemlerden bir tanesidir. Aynı zamanda düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra hayvanları takip etmek için de oldukça uygundur.

SAK sonrası hayatta kalan insanların bir kısmı tamamen iyileşirken diğer bir kısmı ise kronik olarak seyreden işlev kaybı ile yaşamlarına devam etmektedirler. Bu durum kanamanın şiddetine göre değişmektedir. Genel olarak daha az kanamalı insanlar daha çok hayatta kalmakta ve daha az işlev kaybına maruz kalmaktadır (Gaetani vd., 1995; Kakarieka vd., 1994; Ökten vd., 2006). Çalışmamızda, orijinal yöntemden farklı olarak subaraknoid bölgeye 200 µl değil 120 µl kan verilmiştir. Böylelikle ölüm oranlarını en aza indirmeyi hatta mümkünse ortadan kaldırmayı amaçladık. Prunell vd.'nin uyguladığı orijinal yöntemde 200 µl kan uygulaması ile hayvanların % 25'i ölmüştür (Prunell vd., 2002). Jeong vd. ise 250 µl kan uyguladıkları çalışmalarında % 16'lık bir ölüm oranı belirlemişler ancak hayatta kalanlarda yüksek oranda nörolojik hasara rastladıklarını belirtmişlerdir (Jeong vd., 2018). Bizim çalışmamızda 120 µl kan uygulamasının ölümü engellediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda SAK sonrası 24. saatte çıkarılan beyin örneklerinde kanama bölgeleri tespit edilmiş ve kan biriken alanlar çıplak gözle incelenmiştir. Bu incelemelere ait bir fotoğraftan da anlaşılacağı üzere subaraknoid alanda kan biriktiği görülmektedir (Resim 2). SAK çalışmalarında nörolojik hasarın gözlenmesi ancak ölüm oranlarının azaltılması tercih edilen bir sonuçtur. Elde ettiğimiz tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızda 120 µl kan uygulaması ile en düşük ölüm oranına ulaştığımız ancak hayvanlarda değerlendirme yapabilecek düzeyde de nörolojik hasar oluşmasını sağladığımız görülmektedir (Şekil 12).

Çalışmamızda SAK sonrası 24. saatte sıçanlar ilk olarak Garcia nörolojik muayenesinden geçirilmiştir. Aynı sıçanların SAK öncesi nörolojik skorları kaydedilerek SAK sonrası 24. saat verileri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar SAK'ın Garcia skorlarını anlamlı düzeyde azalttığını ve PST'nin bu azalmayı kısmi olmakla birlikte anlamlı düzeyde yükselttiğini gösterdi. Garcia skoru hemen hemen tüm çalışmalarda uygulanan yöntemle bakılmaksızın SAK sonrası nörolojik sistemi değerlendirmede kullanılmaktadır. Cao vd. internal karotid arterin perforasyonu ile SAK modeli oluşturmuşlar ve Garcia skorunun 11'e kadar düştüğünü belirlemişlerdir. Tedavi amaçlı verdikleri liprostatin-1'in Garcia skorunu 14'e kadar yükselttiğini gözlemlemişlerdir (Cao vd., 2021). Başka bir çalışmada ise 250 µl otolog arteriyel kan uygulaması ile yapılan SAK modelinde 24 saat sonraki Garcia skoru 14.11'e kadar düşmüş, glisirizin uygulaması ile bu değer 16.42 olarak belirlenmiştir (Jeong vd., 2018). Hao vd. ise 300 µl kan

uyguladıklarında Garcia skorunun 8'e kadar azaldığını, yüksek doz FoxO1 uygulamasının bu değeri 15'lere kadar yükselttiğini belirlemişlerdir (Hao vd., 2021). Görüleceği üzere SAK sonrası Garcia skoru azalmakta ve bu azalma uygulanan kan miktarına göre değişmektedir. Koruyucu veya tedavi edici ajanlar ise Garcia skorunu yükseltmekte ancak SHAM grubundaki düzeylere tam olarak getirememektedir. Bizim çalışmamızda da SAK sonrası 24. saatte Garcia skoru anlamlı düzeyde azalmış ve PST uygulaması Garcia skorunda ciddi bir iyileşmeye yol açmıştır. Bu sonuçlar PST'nin Garcia skoru verileri üzerinden SAK sonrası nörolojik hasarı anlamlı düzeyde iyileştirici etkisi olduğunu gösteren ilk bulgulardır. Çalışma sonuçlarımız aynı zamanda 120 µl kan uygulamasında bile önemli düzeyde nörolojik hasarın olabileceğini de göstermesi açısından önem arz etmektedir.

SAK sonrası beyinde gözlemlenen değişikliklerden bir tanesi de ödemdir. Ödemin tespiti histopatolojik olarak yapılabileceği gibi total beyin dokusunun kurutulması ile de değerlendirilebilir. Çalışmamızda elde edilen beyin dokuları her iki işleme de tabi tutulmuştur. Ancak aşağıda da görülebileceği gibi histopatolojik düzeyde anlamlı verilere ulaşılmasına rağmen beyin su oranı ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulgular elde edilememiştir. Çalışmamızda beyin su oranını belirlemek için her gruptan 3 hayvan seçilmiştir. Bu hayvanların beyin dokuları 70 °C sıcaklıkta 72 saat süre ile bir etüvde tutulmuş, ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark alınarak beyin dokusu su oranı belirlenmiştir (Ding vd., 2015). Çalışmamızda SAK grubunda beyin su içeriği bir miktar artmış olmasına rağmen bu yükseliş SHAM grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmamıştır. SAK modeli oluşturulan bir çalışmada ise SHAM grubunda yaklaşık % 78 olan beyin su içeriği % 82'lere kadar yükselmiştir (Hu vd., 2022). Bu çalışmada SAK yöntemi arteriyel perforasyon ile gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada ise SHAM grubunda % 60 olarak belirlenen beyin su içeriğinin SAK sonrası % 80'lere kadar çıktığı belirlenmiştir (Hao vd., 2021). Yin vd.'nin yürüttüğü çalışmada ise SAK grubunda % 79,42 olarak hesaplanan beyin su içeriğinin SHAM grubunda % 77,16 değerinde olduğu ifade edilmiştir. Yine bu çalışmada tedavi edici olarak uygulanan deksmedetomidin sonrası beyin su içeriğinin % 78,41'e düştüğü görülmüştür (Yin vd., 2018b). Çalışmamızda beyin su içeriğindeki değişimler literatür ile uyumludur. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun nedeni sadece 3 hayvandan veri elde edilmesi ve hayvanlara

120 µl kan uygulanması olabilir. Bununla birlikte çalışmamızda, hipokampus dokusunda hücrel ödeme düzeyleri histopatolojik seviyede de incelenmiştir. SAK sonrası 24. saatte hücrel ödeme skorunda SHAM grubuna göre anlamlı artışlar belirlenmiştir. PST uygulaması SAK grubundaki bu artışları bir miktar azaltmıştır (Şekil 16). Görüldüğü üzere hipokampusta hem doku su oranı verilerinde hem de histopatolojik ödeme skorlarında, SAK grubunda SHAM grubuna göre bir artış ortaya çıkmış, PST uygulaması ise bu artışları azaltmıştır. Her iki veri açısından PST uygulaması SAK grubuna göre anlamlı bir azalmaya sebep olmasa da histopatolojik düzeyde SAK grubunda görülen artış SHAM grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Bu bulgular SAK uygulamasının ödeme sebep olduğunu açıkça göstermektedir. Çalışmamızda EBH verileri ilk 24 saat içerisinde elde edilmiştir. Bu sebeple PST uygulamasının ödemi düzeltici etkisine yönelik yapacağımız yorumlar ilk 24 saat içerisindeki değişimler ile sınırlı kalmaktadır. SAK sonrası 48. ve 72. saatlerde örnek almadığımız için EBH'nin ilerleyen saatlerinde PST'nin düzeltici bir etkisi olup olmadığını söyleyemeyiz. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca ödemin en büyük nedenlerinden bir tanesi KBB'nin bozulmasıdır (Fujii vd., 2012; Suzuki vd., 2020). Çalışmamızda KBB'nin bozulup bozulmadığına yönelik bir değerlendirme de yapılmamıştır. Dolayısıyla SAK'ta PST uygulamasının KBB üzerine olası etkilerinin de yeni çalışmalar ile ortaya konulması faydalı olacaktır.

Çalışmamızda hem histopatolojik hem de moleküler düzeyde değişimler hipokampus dokusunda incelenmiştir. SAK sonrası beyinde en çok etkilenen bölgelerden bir tanesi hipokampustur. Hipokampusla birlikte en çok incelenen diğer bölge ise beyin korteksidir. Bu nedenle SAK çalışmaları büyük oranda ya hipokampus ya da korteks dokusu üzerinde yürütülmektedir (Cai vd., 2021; Deng vd., 2021; He vd., 2018; Li vd., 2019; Ning vd., 2021; Teng vd., 2020; Tsai vd., 2021; Yang vd., 2019; Zhou vd., 2013; Zhu vd., 2018).

Hipokampusta nöronal hücre ölümlerini belirlemek için çalışmamızda Kristal Viyole boyaması yapıldı. Hipokampusta SAK'tan 24 saat sonra SAK grubunda hem SHAM hem de SAK+PST grubuna göre hasarlı nöron sayısında anlamlı düzeyde artış belirlendi. PST uygulamasının ölü nöron sayılarını anlamlı düzeyde azaltması PST'nin



SAK patogenezinin karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. SAK sonrası sinir ölümlerini azaltıcı ajanların geliştirilmesi ve uygulanması SAK'ın olumsuz sonuçlarının ortadan kaldırılması açısından oldukça önemlidir. Ancak bir ajanın SAK sonrası iyileştirici ve tedavi edici etkilerini yalnız başına Nissl cisimcikleri üzerinden değerlendirmek doğru sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle birçok çalışmada Nissl cisimciklerinin yanı sıra başta apoptoz ve inflamatuvar yollar olmak üzere farklı yollardaki değişimler de incelenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu şekilde bir yol izlenmiştir. Wang vd. bir çalışmada SAK sonrası tioredoksinin etkilerini incelemiştir. Tioredoksin protein sentezinin uyarıldığı grupta SAK grubuna göre hayatta kalan nöron sayılarının anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirlemiştir (Wang vd., 2022). Başka bir çalışmada ise SAK uygulanan sıçanlarda hipokampustaki hücre ölümleri üzerine kannabinoid tip 1 reseptör agonisti (ACEA)'nin etkileri incelenmiştir. Hipokampustaki CA1, CA3 ve dentat girus olmak üzere her 3 bölgede de hücre ölümü görülmüştür. ACEA uygulaması dentat girusa daha az olmak üzere her üç bölgede ortaya çıkan hücre ölümlerini azaltmıştır (Liu vd., 2022). Başka bir çalışmada ise SAK sonrası hücre ölümlerini azaltmak için apelin kullanılmıştır. Apelin'in hücre ölümünü anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir (Shen vd., 2022). Görüleceği üzere SAK sonrası hücre ölümlerini belirlemek için Nissl cisimciklerinin varlığı yaygın olarak kullanılmaktadır. SAK sonrası uygulanan ajanların nöron ölümlerini azaltıcı etkilerinin büyük oranda bu ajanların antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda uygulanan PST de güçlü antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Dolayısıyla ile SAK sonrası nöronal hücre hasarını azaltıcı etkilerinin PST'nin bu özelliğine bağlı ortaya çıktığı söylenebilir.

SAK sonrası beyin hasarının değerlendirilmesinde en çok kullanılan parametre apoptozdur. Çünkü SAK patogenezinde nöronal apoptoz önemli bir rol oynamaktadır (Edebalı vd., 2014). SAK sonrası apoptozun düzenlenmesinde kaspaz-3 anahtar role sahiptir ve kaspaz-3'ün aktivasyonu hücreyi geri dönüşümsüz olarak apoptoza götürür (Yu vd., 2014). SAK oluşturulup, hipokampusta kaspaz-3, Bcl-2 ve Bax dahil apoptoz ile ilişkili faktörlerin ekspresyon seviyeleri araştırılan bir çalışmada bu faktörlerin SAK oluşturulan gruplarda arttığı görülmüştür (He vd., 2018). SAK sonrası apoptozun önemli olması apoptozu azaltıcı etkisi olan birçok ajanın SAK'ın tedavisinde kullanım potansiyelinin araştırılmasına sebep olmuştur. Bu amaçla, puerarin (Zhang vd., 2019a),

HSP27 (Zhou vd., 2022b), siklin bağımlı kinaz-5 (Ding vd., 2022), apelin-13 (Shen vd., 2022) ve RES (Guo vd., 2018; Qian vd., 2017; Zhou vd., 2014b) gibi bir çok ajanın etkisi araştırılmış ve apoptozu azaltıcı etkiler gösterdikleri ortaya konulmuştur. Çalışmamızda PST uygulanan grupta hem TUNEL pozitif hücre sayısında, hem de Bax gen ekspresyon seviyelerinde SAK grubuna göre anlamlı azalmalar ortaya çıktı. PST uygulaması kaspaz-3 gen ekspresyonlarını SHAM grubu değerlerine kadar düşürse de bu azalma SAK grubuna göre anlamlı bulunmadı. Tüm bu sonuçlar PST'nin SAK sonrası artan apoptotik nöron ölümlerini anlamlı düzeyde azalttığını gösterdi. Bu nedenle PST'nin yukarıda bahsedilen ajanlarda olduğu gibi SAK'ta apoptozu azaltıcı ve nöronal hücreleri koruyucu etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

SAK patogeneğinde apoptozu düzenlemede etkinliği ortaya konulmuş bir diğer molekül p53'dür. p53 tümör baskılayıcı bir madde olarak da bilinir. Beyin hücrelerinde hasar oluşması p53'ün proapoptotik proteinler olan Bax ve Bid'i uyarmasına sebep olurken, bu molekül Bcl-2 ve survivini ise baskılayarak apoptozu düzenler (Fridman ve Lowe, 2003). p53 hücre hasarının yanı sıra iskemik durumlarda da salınır ve mitokondriyal hasara yol açar ve kaspazları aktive eder (Culmsee ve Mattson, 2005). Yapılan çalışmalar p53'ün SAK'ta ortaya çıkan sinir hücresi ölümlerinde anahtar moleküllerden birisi olduğunu göstermiştir (Cahill vd., 2007). SAK sonrası p53 genlerinde upregülasyonun 24. veya 72. saatlerde ortaya çıktığı gösterilmiştir (Cahill vd., 2007; Gao vd., 2008). Diğer taraftan p53 inhibitörlerinin SAK sonrası artan ödemi ve hücre ölümlerini azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada kaspaz-3 inhibitörü olarak verilen atorvastatinin de p53'ün SAK sonrası artan apoptotik etkinliğini sınırladığı gösterilmiştir (Cheng vd., 2009). Böylelikle p53'ün proapoptotik etkilerinde en önemli yolun kaspaz-3 üzerinden gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Çalışmamızda SAK sonrası 24. saatte hipokampus örnekleri alınarak p53 gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. SAK grubunda p53 değerlerinin SHAM grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı, PST uygulamasının ise bu değeri SHAM değerine doğru yaklaştırdığı ortaya çıkmıştır. Elde edilen bu sonuçların PST uygulamasında TUNEL pozitif hücre sayıları, kaspaz-3, Bcl-2 ve Bax gen ekspresyonu verileri ile uyumlu olduğu

görülmüştür. Bu sonuçlar PST'nin p53'ün ekspresyonunu düşürerek SAK sonrası artan hücre ölümlerini azalttığını düşündürmektedir.

PST bir RES analogudur. RES çok güçlü bir antioksidan olarak bilinir. PST, RES'ten farklı olarak daha çok suda çözünme özelliği, daha hızlı absorbe olma yeteneği ve yüksek biyoyararlanım özelliklerine sahiptir (Setoguchi vd., 2014; Chen vd., 2016). Bu özellikleri nedeni ile son yıllarda RES yerine PST uygulaması tercih edilmeye başlanmıştır. PST yapı olarak RES'e çok benzemesine karşın her zaman aynı etkiyi göstermeyebilir. RES'in bir çok fizyopatolojik süreçte etkisi bilinmesine rağmen PST'nin etkileri konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Sinir hasarı ve SAK'ta PST'nin etkilerini ortaya koyan bir çalışma ise bildiğimiz kadarı ile bulunmamaktadır. Bununla birlikte PST'nin p53 üzerine olası etkilerini inceleyen birkaç çalışma bulunmaktadır. Öte yandan hem sinir hücrelerinde hem de SAK sonrası sinir ölümlerinde PST ve p53 ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk araştırmadır.

PST ve p53 ilişkisini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan bir tanesinde sisplatine bağlı böbrek hasarında PST'nin etkisi incelenmiştir. PST uygulaması sisplatin toksikasyonuna bağlı artan p53 gen ekspresyon düzeyini anlamlı şekilde azaltmıştır. Bizim çalışmamızdakine benzer şekilde PST uygulanan grupta aynı zamanda kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri de azalmıştır (Wahdan vd., 2019). Başka bir çalışmada ise PST'nin hücre yaşlanması üzerine olan etkileri ve p53 arasındaki ilişki incelenmiştir. Mezenkimal stroma hücrelerine PST uygulamasının p53 gen ekspresyonlarını azalttığı ve böylelikle yaşlanmanın hücreler üzerindeki olumsuz etkilerini sınırlandırdığı bildirilmiştir (Alessio vd., 2021).

SAK sonrası erken beyin hasarında apoptoz ile birlikte görülen bir diğer önemli bulgu inflamasyondur. Hatta inflamasyon apoptoz ve diğer süreçleri indükleyen bir faktör olarak dikkat çekmektedir. Bu nedenle deneysel SAK modellerinde inflamasyon belirteçleri yaygın olarak araştırılmıştır. Çalışmalarda en çok incelenen inflamasyon belirteçleri olarak TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B ve TLR4 dikkat çekmektedir. Elde edilen

verilere bakıldığında SAK sonrası 24. saatte tüm inflamasyon belirteçlerinde artışlar olduğu; TNF- $\alpha$ , IL-6 ve NF- $\kappa$ B’de ortaya çıkan artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar SAK sonrası 24. saatte hipokampus dokusunda bir inflamasyon tablosunun ortaya çıktığını göstermektedir.

TNF- $\alpha$ , IL-6, ve IL-1 $\beta$  proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve nöroinflamasyondaki rolleri oldukça iyi aydınlatılmıştır. SAK’a maruz kalmış insanlarda ilk 72 saat içerisinde TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin yükseldiği ve erken beyin hasarının altında yatan inflamatuvar süreçlerde bu artışın rolü olduğu belirtilmiştir (Inagawa, 2016; Savarraj vd., 2018; Simon ve Grote, 2021) Bu sitokinler ile SAK sonrası erken beyin hasarı ilişkisi deneysel çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada serebral arter duvarında her üç sitokin düzeyinde gözlemlenen ve SAK sonrası 6. saatte başlayan artışın 72. saate kadar devam ettiği belirtilmiştir (Maddahi vd., 2012). Proinflamatuvar sitokin düzeyleri ile infarkt alanı büyüklüğü ve nörolojik işlev kaybı arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir. TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$ ’nın beyindeki hasarlı bölgede yüksek düzeyde eksprese olduğu veya üretildiği tespit edilmiştir (Zaremba ve Losy, 2004). Bu sitokinler aynı zamanda SAK sonrası ortaya çıkan serebral iskemiden de sorumludur (Fassbender vd., 2001; Sercombe vd., 2002). Diğer taraftan sitokin ekspresyonlarındaki değişimler inme tipine ve inmenin lokalize olduğu beyin bölgesine bağlı olarak da farklılık gösterir. İki farklı SAK modeli karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  ekspresyonunun, SAK'dan 2 ve 7 gün sonra beyinde farklı şekilde arttığı ortaya konulmuştur. Serebral arter perforasyonu ile oluşturulan SAK sonrası inflamatuvar cevap 7. güne kadar ortaya çıkarken, bazal sisternalara kan enjeksiyonu ile oluşturulan SAK modelinde, SAK'tan 2 gün sonra beyin dokusunda sitokin düzeylerinde artış bulunmuştur (Prunell vd., 2005b). Bizim çalışmamızda SAK’tan 24 sonra hipokampus örnekleri alınmış ve sitokin düzeylerinin arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da SAK sonrası IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinde artış belirledik. PST uygulanan grupta ise IL-1 $\beta$  seviyeleri SHAM grubundaki değere yakın bulunmuştur. IL-1 $\beta$ , SAK sonrası EBH’nin yanı sıra KBB’nin yapısının bozulması ile de ilişkili bir sitokindir (Sozen vd., 2009). Bu nedenle SAK sonrası EBH ve KBB’nin bozulmasının önüne geçmek için proinflamatuvar sitokin salınımının

azaltılması hedeflerden bir tanesidir. Bu amaçla bir çok ajanın etkisi araştırılmış ve halen araştırılmaya devam edilmektedir. SAK'tan kısa bir süre sonra ortaya çıkan inflamasyon aynı zamanda nöronal apoptozu da tetikleyen önemli bir faktördür. Mikroglia ve astrosit hücreleri bu süreçte görev alırlar. Mikroglialar astrositleri inflamatuvar sitokinleri salgılamak üzere uyarırlar. Astrositlerin etkinliği ise SAK sonrası sinir hücre hasarının en temel nedenlerinden birisi olarak kabul edilir (Harris vd., 2012; Mishra vd., 2016). Astrositlerin etkileri SAK sonrası erken dönemde daha güçlü bir şekilde ortaya çıkar ve aynı zamanda nöronal apoptozla da ilişkilidir. Bu nedenle astrositik aktivitenin azaltılması SAK'ın patogenezinde uygulanan yaklaşımlardan bir tanesidir (Chung vd., 2021). Astrositler inflamasyonun yanında apoptozu da düzenlediğinden astrositlere bağlı apoptozun geciktirilmesi de SAK'a bağlı EBH'yi azaltmak için uygulanan bir başka stratejidir (Sabri vd., 2008). Chung vd. SAK sonrası nöronal hasarı azaltmak için anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik özellikleri olan minosiklin uygulayarak inflamatuvar yanıtı incelemişlerdir. Bu çalışmada SAK sonrası 6 saat içerisinde kanda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin arttığını ancak IL-6 düzeylerinin değişmediğini belirlediler. Minosiklin uygulamasının ise TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerindeki artışları engellediğini ve EBH'nı azaltıcı etki gösterdiğini ortaya koydular (Chung vd., 2021). Başka bir çalışmada ise yine SAK'ta yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde mikroglia hücre aktivasyonu üzerine odaklanılmış ve NLRP3 (NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3) adlı bir inflamazomun ASC (CARD içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein)'ye olan etkisi üzerinden inflamasyon ve nöronal apoptoz değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar mikroglial hücrelerde NLRP3-ASC inflamazomu aktivitesinin azaltılması ile SAK sonrası 24. saatte nöroinflamasyonun baskılandığını, beyin ödeminin ve işlev kaybının azaldığını göstermiştir. Ortaya çıkan bu iyileştirici etkilerin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gen ekspresyonlarında azalmalar ve IL-1 $\beta$  ile apoptoz arasındaki etkileşimlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Hu vd., 2021). Başka bir çalışmada ise beyinde yangısal süreçlerde görev alan bir çeşit protein olan ENT1 (dengeleyici nükleosit taşıyıcı)'in SAK sonrası 24. saatte nöroinflamasyon ve apoptoz üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bir ENT1 inhibitörü olan nitrobenziltiyoinosin uygulamasının nöroinflamasyonu azalttığı ve IL-1 $\beta$  gen ekspresyonlarındaki artışı geriye döndürdüğü belirlenmiştir. Nitrobenziltiyoinosin uygulanan grupta aynı zamanda kaspaz-1 gen ekspresyon seviyelerinin de azaldığı ve daha düşük nöronal apoptoz şekillendiği anlaşılmıştır (Chen vd., 2021).

TNF- $\alpha$  SAK sonrası en hızlı değişen sitokindir. SAK sonrası 1. ve 6. saatlerde bile beyin parankiminde TNF- $\alpha$  gen ekspresyonlarında artışlar olduğu ve bu artışların damarların etrafında bulunan glial hücreler ve astrositlerde yoğunlaştığı belirlenmiştir (Maddahi vd., 2012). TNF- $\alpha$ 'nın iskemik beyin hasarında arttığı çok iyi bilinmektedir. Bir çalışmada iskemi sonrası, 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde beyindeki TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyleri incelenmiş, iskemi sonrası 1. saatte başlayan artışın 12. saatte zirveye ulaştığı ve 24. saatte halen yüksek seyrettiği belirlenmiştir (Liu vd., 1994).

Çalışmamızda SAK sonrası hipokampus dokusunda en düşük IL-6 gen ekspresyonu değeri PST uygulanan grupta saptandı. Bu değeri SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasına rağmen SAK grubunda belirlenen artış SHAM grubuna göre anlamlı bulunmadı. Yukarıda da belirttiğimiz gibi SAK sonrası nöroinflamasyonda rol alan üç temel proinflamatuvar sitokinden bir tanesi IL-6'dır. Çalışma sonuçlarımız IL-6'nın SAK sonrası 24. saatte arttığını ve PST uygulamasının bu artışı engellediğini göstermiştir. IL-1 $\beta$  gibi IL-6 da SAK sonrası beyin hasarında önemli rol oynamaktadır ve etkisi de oldukça iyi tanımlanmıştır. IL-6 beyin hasarında daha çok vazospazm, intrakraniyal basınç artışı, beyin ödemi, KBB'nin bozulması ve nekrotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir (Argaw vd., 2006, Koda vd., 2003; Paul vd., 2003). IL-1 $\beta$ 'nin aksine IL-6 salınımı daha geç ortaya çıkmakta ve IL-6 düzeylerinin apoptozla ilişkisi olmadığına dair bildirimler bulunmaktadır (Berghe vd., 2006; Graetz vd., 2010). Çalışmamızda SAK grubunda belirlenen IL-6 gen ekspresyon seviyesi SHAM grubuna göre yüksek olsa da bu artışın sınırlı olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. İnsan ve deney hayvanı çalışmaları SAK sonrası beyin patogeneğinde IL-6'nın daha çok geç beyin hasarında rolü olduğunu ve yaklaşık 72. saat ve sonrasında etkin olduğunu göstermektedir (Đuriš vd., 2018).

Çalışmamızda SAK sonrası PST uygulaması TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gen ekspresyon seviyelerini azaltmıştır. PST'nin bu azaltıcı etkileri TNF- $\alpha$  ve IL-6 için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Her üç sitokin üzerinden değerlendirildiğinde, elde ettiğimiz sonuçlar PST'nin SAK sonrası artan inflamatuvar yanıtı azalttığını ve anti-inflamatuvar bir etki gösterdiğini söyleyebiliriz. PST'nin inflamasyon üzerine olan etkileri için NF- $\kappa$ B'nin aracılık ettiğine dair bildirimler vardır. NF- $\kappa$ B aktivasyonunun inflamasyona aracılık ettiği ve apoptozu baskıladığı gösterilmiş ve aktive NF- $\kappa$ B'nin romatoid artrit, septik şok ve

miyokardiyal iske mi gibi bir çok inflamatu ar hastalığın patogene zinde rol aldığı belirlenmiştir (Bauerle vd., 1997; Hajra vd., 2000; Miagkov vd., 1998; Nichols vd., 2001; Shishodia vd., 2002). Bu hastalıklarda NF-κB'nin hücre sağ kalım genlerinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı ve TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi proinflamatu ar sitokinlerin ekspresyonunu koordine ettiği bilinmektedir (Roshak vd., 1996; Schmedtje vd., 1997). SAK sonrası nöroinflamasyonu olan hastalarda aktive mikroglia, MSS'deki sitokinlerin ana kaynağıdır (Arora vd., 2018; Mastroeni vd., 2017). Mikroglialardaki NF-κB aktivasyonun artışı TNF-α, IL-6 ve IL-1 gibi proinflamatu ar sitokinlerin salgılanmasını uyarır. Nitekim mikroglial çekirdekte NF-κB transkripsiyonel aktivitesinin bloke edilmesinin TNF-α, IL-6 ve IL-1 gibi proinflamatu ar sitokinlerin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Ye ve Johnson, 2001). Çalışmamızda NF-κB gen ekspresyonlarının SAK sonrası arttığı ve PST uygulamasının bu artışı engellediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar PST'nin TNF-α, IL-6 ve IL-1 gen ekspresyonları üzerine azaltıcı etkilerinin NF-κB üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir.

PST'nin, NF-κB aktivasyonunu baskılama yeteneğinin olduğu hatta bu özelliğinin RES'e göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Hidroksil gruplarından yoksun bir stilben olan rapontisinin NF-κB aktivasyonunu etkilememesi, PST'nin etkisinin hidroksil gruplarından kaynaklandığını göstermektedir. Tüm bu etkiler PST'nin de bir NF-κB blokörü olarak tanımlanmasına sebep olmuştur. PST bu etkisini NF-κB'nin DNA'ya bağlanma etkinliğini azaltarak gösterir (Ashikawa vd., 2002). PST beyin endotel hücrelerinde de NF-κB aktivitesini baskılayıcı etkiye sahiptir. PST'nin bu etkisi aynı zamanda antioksidan özellikleri ile de ilişkilendirilmiştir (Zhou vd., 2022a). PST'nin NF-κB inhibe edici etkisi beyin dışındaki dokularda da tespit edilmiştir (Ashikawa vd., 2002). MSS'de NF-κB yolağını aktive eden faktörler aynı zamanda nöronal hasara da yol açarlar (He vd., 2011). PST'nin NF-κB yolağını baskılaması aynı zamanda beyin endotel hücrelerini hiperoksidanlardan koruyarak KBB'nin bozulmasını da engeller (Zhou vd., 2022a). Literatüre uyumlu olarak çalışmamızda PST uygulanan grupta NF-κB gen ekspresyon düzeyinin azaldığını belirledik. PST uygulanan grupta inflamasyonun yanı sıra; nörolojik skor, ödem ve hücre hasarı verilerinde de iyileşmeler gözlemledik. PST'nin bu iyileştirici etkilerinin NF-κB üzerine olan baskılayıcı özelliklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda inflamasyon açısından değişimini ölçtüğümüz bir diğer molekül TLR4'tür. TLR4'ün SAK patogenezindeki rolü konusunda bildirimler bulunmaktadır. SAK'ta hemoraji alanına dağılan alyuvarların yıkılması TLR4'ü aktive eder (Bulters vd., 2018). TLR4 aktivasyonu NF-kB yolağının uyarılması ile inflamatuvar sürecin başlamasını ve sonuç olarak nöronal hasara doğru gidişi tetikler (Hyzak vd., 2011; Pradilla vd., 2010). Alyuvar harabiyetinin yanı sıra; hem, fibrinojen ve ısı şok proteinleri de SAK'ta TLR4'ün uyarılmasına sebep olan diğer faktörler olarak tanımlanmıştır (Kawakita vd., 2017). Yapılan bir çalışmada SAK sonrası TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada tedavi edici ajan olarak uygulanan 2-PMAP (2-[(Pridin-3-İl-Metilen)Amino]fenol)'nin inflamatuvar sitokinlerle birlikte TLR4 gen ekspresyonlarını da azalttığı görülmüştür. TLR4 gen ekspresyonlarının azaldığı grupta vazospazmın ve apoptozun da azalması TLR4 inhibisyonunun SAK sonrası nöronal hasar için koruyucu bir seçenek olacağını düşündürmüştür (Hanafy, 2013; Wu vd., 2022; Zhou vd., 2015). Nitekim Zhang vd. yaptıkları bir çalışmada TLR4 aktivasyonunu engellemek için RES uygulamışlardır (Zhang vd., 2016a). RES uygulanan grupta inflamasyon ve apoptozun azaldığını, beyin ödemimin küçüldüğünü ve daha düşük nöronal hasar belirtileri ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda literatür bildirimine uygun olarak SAK grubunda TLR4 gen ekspresyonlarında artış gözlemledik. Ancak bir RES analogu olmasına rağmen PST, TLR4 gen ekspresyon seviyelerini anlamlı düzeyde azaltmadı. PST, RES analogu olmasına rağmen RES'in etkilerini her zaman aynı düzeyde göstermez. Elde ettiğimiz sonuçlar buna bağlı olabilir. Bu sonuçlar aynı zamanda PST'nin SAK'taki iyileştirici etkilerini TLR4 dışındaki yollar üzerinden gerçekleştirdiğini de düşündürmektedir. Bu sonuçlar SAK'ta PST-TLR4 ilişkisini ortaya koyan öncü bulgulardır. SAK'ta PST-TLR4 ilişkisi hakkında daha net yorumlar yapabilmek için 48. ve 72. saatlerde de beyin dokusunun inceleneceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda apoptoz ve inflamasyon üzerine SAK ve PST uygulamasının etkilerini literatür ile uyumlu bulmuş olmamıza rağmen SIRT1 gen ekspresyonları açısından elde ettiğimiz verilerde literatür ile bir benzerlik gözlemedik. Çalışmamız PST'nin SAK'a bağlı EBH üzerine koruyucu etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. SIRT1 bir NAD<sup>+</sup> bağımlı sınıf III histon deasetilaz olup oldukça farklı bir çok hücresel işlevde görev alır (Zhang vd., 2016b). Beyinde de bir çok alanda eksprese olur ve sinir hücre hasarına karşı koruyucu etki



gösterir (Chen vd., 2018). Bir çalışmada SIRT1'in nöroinflamasyonu ve apoptozu baskılayarak serebral iskemiye karşı sinir hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (Hernández-Jiménez vd., 2013). Başka bir çalışmada ise serebral kanamada SIRT1 aktivasyonunun mitokondriyal işlevleri iyileştirdiği ve yine nöronal hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Zhou vd., 2018). SIRT1'in bu etkileri SAK'ta SIRT1'in koruyucu rolünün araştırılmasına yol açmıştır. Bu konuda yapılan birçok çalışma ile SAK'ta SIRT1'in etkisi bildirilmiştir. Yapılan bir çalışma, SAK sonrası SIRT1 gen ekspresyon düzeylerinin artırılmasının nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona karşı koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Lin vd., 2022). Farmakolojik olarak SIRT1 aktivasyonunun artırılmasının sinir hasarına karşı koruyucu etki oluşturduğunu ortaya koyan başka çalışmalar da bulunmaktadır (Liu vd., 2021; Xia vd., 2021; Xu vd., 2021b). SIRT1 SAK'ta serebral vazospazm üzerine de koruyucu etki gösterir (Vellimana vd., 2020). Diğer taraftan PST bir SIRT1 aktivatörüdür ve SIRT1 aktivasyonunu sağlayarak inflamasyonu azaltır, hücreleri apoptoza karşı korur (Wang vd., 2020b). RES'in iskemi veya anoksi durumlarında koruyucu etki gösterdiği iyi bilinmektedir. RES bu etkisini SIRT1 aktivasyonu üzerinden HIF-1 $\alpha$  (hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa) gen ekspresyonunu artırması ile gerçekleştirir. RES'e benzer yapısı nedeni ile PST'nin de bu şekilde etki gösterdiği düşünülmektedir (Wang vd., 2020b). Çalışmamızda PST uygulaması anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etki göstermesine rağmen SIRT1 gen ekspresyonları üzerine anlamlı bir etki ortaya çıkmadı. Bu durum SAK'ta PST'nin SIRT1'den bağımsız başka mekanizmalar üzerinden de koruyucu etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

## 5.2. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda prekiyazmatik sistemaya kan enjeksiyonu yöntemi ile SAK modeli oluşturulan Wistar cinsi erkek sıçanlarda PST'nin tedavi edici etkileri histopatolojik ve moleküler düzeyde incelendi. SAK modellemesi öncesi ve sonrasında yaptığımız nörodavranışsal inceleme ile PST'nin motor aktivite bozukluğunu iyileştirici etkisi ortaya konuldu. PST uygulamasının SAK'ı takiben hücresel düzeyde beyin ödemi ve piknozu azaltarak EBH'yi önemli ölçüde iyileştirdiği gözlemlendi. Bunun yanı sıra SAK modeli oluşturulan gruplarda hasarlı nöronal hücre sayısının arttığı ve PST uygulamasıyla bu sayının azaldığı anlaşıldı. SAK patogeneğinde nöronal apoptozun önemli rol oynadığı bilinen bir gerçektir (Yuksel vd., 2012). Bu nedenle çalışmamızda nöronal apoptoz hem TUNEL boyama ile histopatolojik olarak hem de RT-PCR yöntemi ile moleküler düzeyde değerlendirildi. TUNEL boyama sonuçlarına göre SAK grubundaki TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı ve PST uygulamasıyla apoptotik hücre sayısının azaldığı anlaşıldı. Moleküler düzeyde ise hücre apoptoz yolaklarında yer alan ve hücreyi ölüme götüren moleküller olan p53, kaspaz-3 ve Bax gen ekspresyon seviyelerinin PST uygulaması ile azaldığı belirlendi. Bütün bu sonuçlara göre PST'nin SAK'ta apoptozu azaltıcı ve nöronları koruyucu etkisi olduğunu söylenebilir.

SAK'ta inflamatuvar bir süreç mevcut olup bu durum hastalığın prognozu açısından önem arz etmektedir (Dumont vd., 2003). Bu nedenle çalışmamızda inflamatuvar yollarda görev alan TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, TLR4 ve SIRT1 gibi bazı moleküllerin gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. SAK sonrası PST uygulamasının TNF- $\alpha$ , IL-6 ve NF- $\kappa$ B düzeylerini azalttığı anlaşıldı. Bu bulgular, PST uygulamasının SAK sonrası doğrudan inflamatuvar ve apoptoz yollarını hedef aldığı yönündeki hipotezimizi desteklemektedir.

Sonuç olarak; bulgularımız PST'nin deneysel SAK modelinde, beyin temel moleküler sinyallerini hedeflemesi yoluyla EBH tedavisinde terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların azlığı ve mekanizmaların tam anlamıyla aydınlatılamamış olması nedeniyle, PST uygulamasının

SAK üzerindeki etkilerini ve altında yatan mekanizmayı ortaya çıkaracak geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız, deneysel SAK'ta PST uygulamasının hipokampus dokusunda inflamasyon ve apoptoz üzerindeki etkilerinin belirlendiği ilk çalışma olup bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalar için katkı sağlayacaktır.



## KAYNAKÇA

- Adams, H. P. ve Gordon, D. L. (1991). “Nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage”. *Annals of Neurology*, 29(5), 461-462.
- Alessio, N., Squillaro, T., Lettiero, I., Galano, G., De Rosa, R., Peluso, G., ... ve Di Bernardo, G. (2021). “Biomolecular evaluation of piceatannol’s effects in counteracting the senescence of mesenchymal stromal cells: a new candidate for senotherapeutics?”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11619.
- Anton, N., Benoit, J. P. ve Saulnier, P. (2008). “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates”—a review. *Journal of Controlled Release*, 128(3), 185-199.
- Antonsson, B. ve Martinou, J. C. (2000). “The Bcl-2 protein family”. *Experimental Cell Research*, 256(1), 50-57.
- Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M. L., Kopp, N., Lee, S. C., ... ve John, G. R. (2006). “IL-1 $\beta$  regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program”. *The Journal of Immunology*, 177(8), 5574-5584.
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P. ve Syed, M. A. (2018). “Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases”. *Immunobiology*, 223(4-5), 383-396.
- Ashikawa, K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A. C., Shishodia, S. ve Aggarwal, B. B. (2002). “Piceatannol inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B activation and NF- $\kappa$ B-mediated gene expression through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation”. *The Journal of Immunology*, 169(11), 6490-6497.
- Baeuerle, P. A. ve Baichwal, V. R. (1997). “NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules”. *Advances in Immunology*, 65, 111-138.
- Bagli, E., Goussia, A., Moschos, M. M., Agnantis, N. ve Kitsos, G. (2016). “Natural compounds and neuroprotection: mechanisms of action and novel delivery systems”. *In vivo*, 30(5), 535-547.

- Becatti, M., Taddei, N., Cecchi, C., Nassi, N., Nassi, P. A. ve Fiorillo, C. (2012). "SIRT1 modulates MAPK pathways in ischemic-reperfused cardiomyocytes". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(13), 2245-2260.
- Bederson, J. B., Connolly Jr, E. S., Batjer, H. H., Dacey, R. G., Dion, J. E., Diringer, M. N., ... ve Rosenwasser, R. H. (2009). "Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association". *Stroke*, 40(3), 994-1025.
- Bederson, J. B., Germano, I. M. ve Guarino, L. (1995). "Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat". *Stroke*, 26(6), 1086-1092.
- Benveniste, E. N., Liu, Y., McFarland, B. C. ve Qin, H. (2014). "Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis". *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(8), 577-588.
- Berghe, T. V., Kalai, M., Denecker, G., Meeus, A., Saelens, X. ve Vandenamee, P. (2006). "Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not". *Cellular Signalling*, 18(3), 328-335.
- Bolander, H. G., Kourtopoulos, H. ve West, K. A. (1984). "Retrospective analysis of 162 consecutive cases of ruptured intracranial aneurysms. Total mortality and early surgery". *Acta Neurochirurgica*, 70(1), 31-41.
- Bonita, R. (1986). "Cigarette smoking, hypertension and the risk of subarachnoid hemorrhage: a population-based case-control study". *Stroke*, 17(5), 831-835.
- Broderick, J. P., Brott, T. G., Duldner, J. E., Tomsick, T. ve Leach, A. (1994). "Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage". *Stroke*, 25(7), 1342-1347.
- Bruckheimer, E. M., Cho, S. H., Sarkiss, M., Herrmann, J. ve McDonnell, T. J. (1998). "The Bcl-2 gene family and apoptosis". *Apoptosis*, 75-105.

- Bulters, D., Gaastra, B., Zolnourian, A., Alexander, S., Ren, D., Blackburn, S. L., ... ve Galea, I. (2018). "Haemoglobin scavenging in intracranial bleeding: biology and clinical implications". *Nature Reviews Neurology*, 14(7), 416-432.
- Cahill, J., Calvert, J. W., Marcantonio, S. ve Zhang, J. H. (2007). "p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage". *Neurosurgery*, 60(3), 531-545.
- Cai, L., Ge, B., Xu, S., Chen, X. ve Yang, H. (2021). "Up-regulation of circARF3 reduces blood-brain barrier damage in rat subarachnoid hemorrhage model via miR-31-5p/MyD88/NF- $\kappa$ B axis". *Aging (Albany NY)*, 13(17), 21345.
- Cakir, M., Ahiskalioglu, A., Karadeniz, E., Aydin, M. D., Malcok, U. A., Soyalp, C., ... ve Yayik, A. M. (2019). "A new described mechanisms of intestinal glandular atrophy induced by vagal nerve/Auerbach network degeneration following subarachnoid hemorrhage: The first experimental study". *Journal of Clinical Neuroscience*, 59, 305-309.
- Cao, C. X., Yang, Q. W., Lv, F. L., Cui, J., Fu, H. B. ve Wang, J. Z. (2007). "Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(2), 509-514.
- Cao, Y., Li, Y., He, C., Yan, F., Li, J. R., Xu, H. Z., ... ve Wang, L. (2021). "Selective ferroptosis inhibitor liproxstatin-1 attenuates neurological deficits and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage". *Neuroscience Bulletin*, 37(4), 535-549.
- Chang, C. Z., Wu, S. C. ve Kwan, A. L. (2015). "A purine antimetabolite attenuates toll-like receptor-2,-4, and subarachnoid hemorrhage-induced brain apoptosis". *Journal of Surgical Research*, 199(2), 676-687.
- Chang, H. C. ve Guarente, L. (2014). "SIRT1 and other sirtuins in metabolism". *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(3), 138-145.
- Chen, W. P., Hung, L. M., Hsueh, C. H., Lai, L. P. ve Su, M. J. (2009). Piceatannol, a derivative of resveratrol, moderately slows INa inactivation and exerts antiarrhythmic action in ischaemia-reperfused rat hearts. *British journal of pharmacology*, 157(3), 381-391.

- Chen, W., Yeo, S. C. M., Elhennawy, M. G. A. A. ve Lin, H. S. (2016). "Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol". *Journal of Functional Foods*, 22, 122-131.
- Chen, W., Yeo, S. C. M., Elhennawy, M. G. A. A., Xiang, X. ve Lin, H. S. (2015). "Determination of naturally occurring resveratrol analog trans-4, 4'-dihydroxystilbene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(19), 5793-5801.
- Chen, X., Chen, C., Fan, S., Wu, S., Yang, F., Fang, Z., ... ve Li, Y. (2018). "Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates the inflammatory response by modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF- $\kappa$ B pathway following experimental traumatic brain injury". *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1-15.
- Chen, X., Luo, X., Hu, H. ve Xu, Q. (2021). "NBTI attenuates neuroinflammation and apoptosis partly by ENT1/NLRP3/Bcl2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats". *NeuroReport*, 32(17), 1341.
- Cheng, G., Wei, L., Zhi-Dan, S., Shi-Guang, Z. ve Xiang-Zhen, L. (2009). "Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway". *BMC Neuroscience*, 10(1), 1-11.
- Cheng, Y., Li, S., Liu, Y., Li, J., Chen, Y. ve Zhao, H. (2020). "Treatment of brain edema by wogonoside is associated with inhibition of neuronal apoptosis and SIRT1 activation in rats". *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e921250-1.
- Chou, S. H. Y., Feske, S. K., Atherton, J., Konigsberg, R. G., De Jager, P. L., Du, R., ... ve Ning, M. (2012). "Early elevation of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with poor outcome in subarachnoid hemorrhage". *Journal of Investigative Medicine*, 60(7), 1054-1058.

- Chung, C. L., Tsai, H. P., Huang, Y. H., Wu, S. C., Chai, C. Y. ve Kwan, A. L. (2021). "Attenuation in Proinflammatory Factors and Reduction in Neuronal Cell Apoptosis and Cerebral Vasospasm by Minocycline during Early Phase after Subarachnoid Hemorrhage in the Rat". *BioMed Research International*, 2021.
- Claassen, J., Carhuapoma, J. R., Kreiter, K. T., Du, E. Y., Connolly, E. S. ve Mayer, S. A. (2002). "Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome". *Stroke*, 33(5), 1225-1232.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., ... ve Slack, R. S. (2002). "Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death". *The Journal of Cell Biology*, 158(3), 507-517.
- Culmsee, C. ve Mattson, M. P. (2005). "p53 in neuronal apoptosis". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 761-777.
- Dandy, W. E. (1938). "Intracranial aneurysm of the internal carotid artery: cured by operation". *Annals of Surgery*, 107(5), 654.
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., ... ve Bhattacharya, P. (2020). "Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy". *Translational Stroke Research*, 11(6), 1185-1202.
- de Rooij, N. K., Linn, F. H., van der Plas, J. A., Algra, A. ve Rinkel, G. J. (2007). "Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 78(12), 1365-1372.
- Delgado, T. J., Brismar, J. ve Svendgaard, N. A. (1985). "Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries". *Stroke*, 16(4), 595-602.
- Deng, X., Liang, C., Qian, L. ve Zhang, Q. (2021). "miR-24 targets HMOX1 to regulate inflammation and neurofunction in rats with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage". *American Journal of Translational Research*, 13(3), 1064.



- Dinareello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases". *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(14), 3720-3732.
- Ding, K., Xu, J., Wang, H., Zhang, L., Wu, Y. ve Li, T. (2015). "Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice". *Neurochemistry International*, 91, 46-54.
- Ding, Y., Zhang, L., Zhou, W., Lu, H., Gao, X., Li, J., ... ve Zheng, J. (2022). "Role of cyclin-dependent kinase 5 in early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(2), 1-10.
- Donmez, G. (2012). "The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration". *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(9), 494-501.
- Dumont, A. S., Dumont, R. J., Chow, M. M., Lin, C. L., Calisaneller, T., Ley, K. F., ... ve Lee, K. S. (2003). "Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation". *Neurosurgery*, 53(1), 123-135.
- Đuriš, K., Neuman, E., Vybíhal, V., Juráň, V., Gottwaldová, J., Kýr, M., ... ve Smrčka, M. (2018). "Early dynamics of interleukin-6 in cerebrospinal fluid after aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Journal of Neurological Surgery Part A: Central European Neurosurgery*, 79(02), 145-151.
- Edebali, N., Tekin, İ. Ö., Açıkgöz, B., Açıkgöz, Ş., Barut, F., Sevinç, N. ve Sümbüloğlu, V. (2014). "Apoptosis and necrosis in the circumventricular organs after experimental subarachnoid hemorrhage as detected with annexin V and caspase 3 immunostaining". *Neurological Research*, 36(12), 1114-1120.
- Edlich, F. (2018). "BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(1), 26-34.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death". *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Erdoğan V. (2017) "Subaraknoid Kanamalarda Mortaliteye Etki Eden Faktörler". *Uzmanlık Tezi*, s;2-26.

- Ersahin, M., Toklu, H. Z., Çetinel, Ş., Yüksel, M., Yeğen, B. Ç. ve Şener, G. (2009). "Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms". *Journal of Pineal Research*, 46(3), 324-332.
- Etminan, N., Chang, H. S., Hackenberg, K., De Rooij, N. K., Vergouwen, M. D., Rinkel, G. J. ve Algra, A. (2019). "Worldwide incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage according to region, time period, blood pressure, and smoking prevalence in the population: a systematic review and meta-analysis". *JAMA Neurology*, 76(5), 588-597.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. ve Liang, J. (2005). "Caspase family proteases and apoptosis". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719-727.
- Farber, J. L., Chien, K. R. ve Mitnacht Jr, S. (1981). "Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia". *The American Journal of Pathology*, 102(2), 271.
- Fassbender, K., Hodapp, B., Rossol, S., Bertsch, T., Schmeck, J., Schütt, S., ... ve Hennerici, M. (2001). "Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 70(4), 534-537.
- Feigin, V. L., Rinkel, G. J., Lawes, C. M., Algra, A., Bennett, D. A., van Gijn, J. ve Anderson, C. S. (2005). "Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies". *Stroke*, 36(12), 2773-2780.
- Fridman, J. S. ve Lowe, S. W. (2003). "Control of apoptosis by p53". *Oncogene*, 22(56), 9030-9040.
- Friedrich, V., Flores, R., Muller, A. ve Sehba, F. A. (2010). "Luminal platelet aggregates in functional deficits in parenchymal vessels after subarachnoid hemorrhage". *Brain Research*, 1354, 179-187.
- Fu, Z., Yang, J., Wei, Y. ve Li, J. (2016). "Effects of piceatannol and pterostilbene against  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis on the PI3K/Akt/Bad signaling pathway in PC12 cells". *Food & Function*, 7(2), 1014-1023.

- Fujii, M., Duris, K., Altay, O., Soejima, Y., Sherchan, P. ve Zhang, J. H. (2012). "Inhibition of Rho kinase by hydroxyfasudil attenuates brain edema after subarachnoid hemorrhage in rats". *Neurochemistry International*, 60(3), 327-333.
- Gaetani, P., Tancioni, F., Tartara, F., Carnevale, L., Brambilla, G., Mille, T. ve y Baena, R. R. (1995). "Prognostic value of the amount of post-traumatic subarachnoid haemorrhage in a six month follow up period". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 59(6), 635-637.
- Gao, C., Liu, X., Liu, W., Shi, H., Zhao, Z., Chen, H. ve Zhao, S. (2008). "Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats". *Autonomic Neuroscience*, 141(1-2), 22-30.
- Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. ve Hu, X. J. (1995). "Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation". *Stroke*, 26(4), 627-635.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. ve Piette, J. (2006). "NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later". *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493-1505.
- Graetz, D., Nagel, A., Schlenk, F., Sakowitz, O., Vajkoczy, P. ve Sarrafzadeh, A. (2010). "High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Neurological Research*, 32(7), 728-735.
- Grell, M., Zimmermann, G., Hülser, D., Pfizenmaier, K. ve Scheurich, P. (1994). "TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways". *The Journal of Immunology*, 153(5), 1963-1972.
- Gu, C., Wang, Y., Li, J., Chen, J., Yan, F., Wu, C. ve Chen, G. (2015). "Rosiglitazone attenuates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats". *Brain Research*, 1624, 199-207.
- Guo, D., Xie, J., Zhao, J., Huang, T., Guo, X. ve Song, J. (2018). "Resveratrol protects early brain injury after subarachnoid hemorrhage by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the Akt/mTOR pathway". *Neuroreport*, 29(5), 368.
- Gurina, T. S. ve Simms, L. (2020). "Histology, Staining".

- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). "Methods for detection of apoptosis". *Yüziüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- Hackett, M. L. ve Anderson, C. S. (2000). "Health outcomes 1 year after subarachnoid hemorrhage: an international population-based study". *Neurology*, 55(5), 658-662.
- Hajra, L., Evans, A. I., Chen, M., Hyduk, S. J., Collins, T. ve Cybulsky, M. I. (2000). "The NF- $\kappa$ B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9052-9057.
- Hanafy, K. A. (2013). "The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage". *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1-10.
- Hanafy, K. A., Grobelny, B., Fernandez, L., Kurtz, P., Connolly, E. S., Mayer, S. A., ... ve Badjatia, N. (2010). "Brain interstitial fluid TNF- $\alpha$  after subarachnoid hemorrhage". *Journal of the Neurological Sciences*, 291(1-2), 69-73.
- Hao, H., Bai, Y., Liu, Y., Liang, J. ve Guo, S. (2021). "Protective mechanism of FoxO1 against early brain injury after subarachnoid hemorrhage by regulating autophagy". *Brain and Behavior*, 11(11), e2376.
- Hara, A., Yoshimi, N. ve Mori, H. (1998). "Evidence for apoptosis in human intracranial aneurysms". *Neurological Research*, 20(2), 127-130.
- Harris, J. J., Jolivet, R. ve Attwell, D. (2012). "Synaptic energy use and supply". *Neuron*, 75(5), 762-777.
- Hasegawa, Y., Suzuki, H., Sozen, T., Altay, O. ve Zhang, J. H. (2011). "Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm*, 43-48.
- He, F., Peng, J., Deng, X. L., Yang, L. F., Wu, L. W., Zhang, C. L. ve Yin, F. (2011). "RhoA and NF- $\kappa$ B are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability". *Neuroscience*, 188, 35-47.

- He, X., Sun, J. ve Huang, X. (2018). "Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(1), 873-877.
- He, Y., Xu, L., Li, B., Guo, Z. N., Hu, Q., Guo, Z., ... ve Zhang, J. H. (2015). "Macrophage-inducible C-type lectin/spleen tyrosine kinase signaling pathway contributes to neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats". *Stroke*, 46(8), 2277-2286.
- Hernández-Jiménez, M., Hurtado, O., Cuartero, M. I., Ballesteros, I., Moraga, A., Pradillo, J. M., ... ve Moro, M. A. (2013). "Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage". *Stroke*, 44(8), 2333-2337.
- Herskovits, A. Z. ve Guarente, L. (2014). "SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence". *Neuron*, 81(3), 471-483.
- Hicks, B. M., Kristensen, K. B., Pedersen, S. A., Hölmich, L. R. ve Pottegård, A. (2019). "Hormone replacement therapy and the risk of melanoma in post-menopausal women". *Human Reproduction*, 34(12), 2418-2429.
- Hou, Y., Wang, K., Wan, W., Cheng, Y., Pu, X. ve Ye, X. (2018). "Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats". *Genes & Diseases*, 5(3), 245-255.
- Hu, H. M., Li, B., Wang, X. D., Guo, Y. S., Hui, H., Zhang, H. P., ... ve Hao, D. J. (2018). "Fluoxetine is neuroprotective in early brain injury via its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model". *Neuroscience Bulletin*, 34(6), 951-962.
- Hu, Q., Du, Q., Yu, W. ve Dong, X. (2022). "2-Methoxyestradiol Alleviates Neuroinflammation and Brain Edema in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Rats". *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 190.
- Hu, X., Yan, J., Huang, L., Araujo, C., Peng, J., Gao, L., ... ve Zhang, J. H. (2021). "INT-777 attenuates NLRP3-ASC inflammasome-mediated neuroinflammation via TGR5/cAMP/PKA signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats". *Brain, Behavior, and Immunity*, 91, 587-600.

- Hwang, J. W., Yao, H., Caito, S., Sundar, I. K. ve Rahman, I. (2013). "Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence". *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 95-110.
- Hyzak, L., Moos, R., von Rath, F., Wulf, V., Wirtz, M., Melchior, D., ... ve Schmitz, O. J. (2011). "Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry analysis of synthetic polymers and peptides". *Analytical Chemistry*, 83(24), 9467-9471.
- Ieong, C., Sun, H., Wang, Q. ve Ma, J. (2018). "Glycyrrhizin suppresses the expressions of HMGB1 and ameliorates inflammatory effect after acute subarachnoid hemorrhage in rat model". *Journal of Clinical Neuroscience*, 47, 278-284.
- Igney, F. H. ve Krammer, P. H. (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis". *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277-288.
- Inagawa, T. (2016). "Risk factors for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review of the literature". *World Neurosurgery*, 85, 56-76.
- Ishibashi, T., Murayama, Y., Urashima, M., Saguchi, T., Ebara, M., Arakawa, H., ... ve Abe, T. (2009). "Unruptured intracranial aneurysms: incidence of rupture and risk factors". *Stroke*, 40(1), 313-316.
- Jabbarli, R., Pierscianek, D., Darkwah Oppong, M., Sato, T., Dammann, P., Wrede, K. H., ... ve Sure, U. (2020). "Laboratory biomarkers of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: a systematic review". *Neurosurgical Review*, 43(3), 825-833.
- Jeon, H., Ai, J., Sabri, M., Tariq, A. ve Macdonald, R. L. (2010). "Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats". *Neuroscience*, 169(4), 1805-1814.
- Johnston, S. C., Colford, J. M. ve Gress, D. R. (1998). "Oral contraceptives and the risk of subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis". *Neurology*, 51(2), 411-418.
- Jordan, J. D. ve Nyquist, P. (2010). "Biomarkers and vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Neurosurgery Clinics*, 21(2), 381-391.

- Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z. ve Fekete, C. (2009). "Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining". *Journal of Neuroscience Methods*, 184(1), 115-118.
- Kakarieka, A., Braakman, R. ve Schakel, E. (1994). "Clinical significance of the finding of subarachnoid blood on CT scan after head injury". *Acta Neurochirurgica*, 129(1), 1-5.
- Kalariya, N. M., Shoeb, M., Reddy, A. B., Sawhney, R. ve Ramana, K. V. (2013). "Piceatannol suppresses endotoxin-induced ocular inflammation in rats".
- Kaptain, G. J., Lanzino, G. ve Kassell, N. F. (2000). "Subarachnoid Haemorrhage. Drugs & aging", 17(3), 183-199.
- Kassell, N. F., Torner, J. C., Haley, E. C., Jane, J. A., Adams, H. P. ve Kongable, G. L. (1990). "The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery: Part 1: Overall management results". *Journal of Neurosurgery*, 73(1), 18-36.
- Kawakita, F., Fujimoto, M., Liu, L., Nakano, F., Nakatsuka, Y. ve Suzuki, H. (2017). "Effects of Toll-like receptor 4 antagonists against cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in mice". *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6624-6633.
- Kim, W. J., Rivera, M. N., Coffman, E. J. ve Haber, D. A. (2012). "The WTX tumor suppressor enhances p53 acetylation by CBP/p300". *Molecular Cell*, 45(5), 587-597.
- Koda, Y., Seto, Y., Takeichi, S. ve Kimura, H. (2003). "Fatal subarachnoid hemorrhage complicating actinomycotic meningitis". *Forensic Science International*, 134(2-3), 169-171.
- Korsmeyer, S. J. (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death". *Cancer Research*, 59(7 Suppl), 1693s-1700s.
- Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E. ve Oltvai, Z. N. (1993, December). "Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death". *In Seminars in Cancer Biology* (Vol. 4, No. 6, pp. 327-332).

- Kumral K. (1975) “Serebrovasküler hastalıklar”. *Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası*.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. ve Kioussi, C. (2012). “Detection of apoptosis by TUNEL assay”. *In Odontogenesis* (pp. 41-47). Humana Press.
- Latruffe, N. ve Vervandier-Fasseur, D. (2018). “Strategic syntheses of vine and wine resveratrol derivatives to explore their effects on cell functions and dysfunctions”. *Diseases*, 6(4), 110.
- Li, J., Chen, S., Fan, J., Zhang, G. ve Ren, R. (2019). “Minocycline attenuates experimental subarachnoid hemorrhage in rats”. *Open Life Sciences*, 14(1), 595-602.
- Li, S., Xiao, X., Ni, X., Ye, Z., Zhao, J. ve Hang, C. (2017). “Tetramethylpyrazine protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by affecting mitochondrial-dependent caspase-3 apoptotic pathway”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Li, Y., Xia, Z. L. ve Chen, L. B. (2011). “HIF-1-alpha and survivin involved in the anti-apoptotic effect of 2ME2 after global ischemia in rats”. *Neurological Research*, 33(6), 583-592.
- Lin, W., Yao, H., Lai, J., Zeng, Y., Guo, X., Lin, S., ... ve Chen, X. (2022). “Cycloastragenol Confers Cerebral Protection after Subarachnoid Hemorrhage by Suppressing Oxidative Insults and Neuroinflammation via the SIRT1 Signaling Pathway”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., ... ve Thompson, C. B. (2000). “The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues”. *Molecular Cell*, 6(6), 1389-1399.
- Linn, F. H. H., Rinkel, G. J. E., Algra, A. ve Van Gijn, J. (1996). “Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis”. *Stroke*, 27(4), 625-629.



- Liu, B., Tian, Y., Li, Y., Wu, P., Zhang, Y., Zheng, J. ve Shi, H. (2022). “Acea attenuates oxidative stress by promoting mitophagy via cb1r/nrf1/pink1 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Liu, F. Y., Cai, J., Wang, C., Ruan, W., Guan, G. P., Pan, H. Z., ... ve Chen, G. (2018). “Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway”. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1-14.
- Liu, M., Jayaraman, K., Giri, T., Zipfel, G. J. ve Athiraman, U. (2021). “Role of SIRT1 in isoflurane conditioning-induced neurovascular protection against delayed cerebral ischemia secondary to subarachnoid hemorrhage”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4291.
- Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C. ve Feuerstein, G. Z. (1994). “Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons”. *Stroke*, 25(7), 1481-1488.
- Long, B., Koyfman, A. ve Runyon, M. S. (2017). “Subarachnoid hemorrhage: updates in diagnosis and management”. *Emergency Medicine Clinics*, 35(4), 803-824.
- Lovelock, C. E., Rinkel, G. J. E. ve Rothwell, P. M. (2010). “Time trends in outcome of subarachnoid hemorrhage: population-based study and systematic review”. *Neurology*, 74(19), 1494-1501.
- Lu, Y., Zhang, X. S., Zhang, Z. H., Zhou, X. M., Gao, Y. Y., Liu, G. J., ... ve Hang, C. H. (2018). “Peroxiredoxin 2 activates microglia by interacting with Toll-like receptor 4 after subarachnoid hemorrhage”. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1-10.
- Lucas, J., Hsieh, T. C., Halicka, H. D., Darzynkiewicz, Z. ve Wu, J. M. (2018). “Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs via HDAC3/p300-mediated NF- $\kappa$ B signaling”. *International Journal of Oncology*, 53(4), 1469-1480.

- Lucke-Wold, B. P., Logsdon, A. F., Manoranjan, B., Turner, R. C., McConnell, E., Vates, G. E., ... ve Simard, J. M. (2016). "Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and neuroinflammation: a comprehensive review". *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 497.
- Maddahi, A., Povlsen, G. ve Edvinsson, L. (2012). "Regulation of enhanced cerebrovascular expression of proinflammatory mediators in experimental subarachnoid hemorrhage via the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway". *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1-16.
- Madonna, R. ve De Caterina, R. (2012). "Relevance of new drug discovery to reduce NF- $\kappa$ B activation in cardiovascular disease". *Vascular Pharmacology*, 57(1), 41-47.
- Marbacher, S., Grüter, B., Schöpf, S., Croci, D., Nevzati, E., D'Alonzo, D., ... ve Fandino, J. (2019). "Systematic review of in vivo animal models of subarachnoid hemorrhage: species, standard parameters, and outcomes". *Translational Stroke Research*, 10(3), 250-258.
- Martinvalet, D., Zhu, P. ve Lieberman, J. (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis". *Immunity*, 22(3), 355-370.
- Maruki-Uchida, H., Morita, M., Yonei, Y. ve Sai, M. (2018). "Effect of passion fruit seed extract rich in piceatannol on the skin of women: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial". *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 75-80.
- Mastroeni, D., Sekar, S., Nolz, J., Delvaux, E., Lunnon, K., Mill, J., ... ve Coleman, P. D. (2017). "ANK1 is up-regulated in laser captured microglia in Alzheimer's brain; the importance of addressing cellular heterogeneity". *PloS one*, 12(7), e0177814.
- Mathiesen, T., Andersson, B., Loftenius, A. ve von Holst, H. (1993). "Increased interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid following subarachnoid hemorrhage". *Journal of Neurosurgery*, 78(4), 562-567.

- Matz, P., Weinstein, P., States, B., Honkaniemi, J. ve Sharp, F. R. (1996). "Subarachnoid injections of lysed blood induce the hsp70 stress gene and produce DNA fragmentation in focal areas of the rat brain". *Stroke*, 27(3), 504-513.
- Mendiola, A. S. ve Cardona, A. E. (2018). "The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases". *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 781-795.
- MH Young, A., K Karri, S., You, W. ve S Ogilvy, C. (2012). "Specific TNF-alpha inhibition in cerebral aneurysm formation and subarachnoid hemorrhage". *Current Drug Safety*, 7(3), 190-196.
- Miagkov, A. V., Kovalenko, D. V., Brown, C. E., Didsbury, J. R., Cogswell, J. P., Stimpson, S. A., ... ve Makarov, S. S. (1998). "NF- $\kappa$ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13859-13864.
- Miller, B. A., Turan, N., Chau, M. ve Pradilla, G. (2014). "Inflammation, vasospasm, and brain injury after subarachnoid hemorrhage". *BioMed Research International*, 2014.
- Min, L. J., Iwanami, J., Shudou, M., Bai, H. Y., Shan, B. S., Higaki, A., ... ve Horiuchi, M. (2020). "Deterioration of cognitive function after transient cerebral ischemia with amyloid- $\beta$  infusion—possible amelioration of cognitive function by AT2 receptor activation". *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1-18.
- Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A. ve Attwell, D. (2016). "Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles". *Nature Neuroscience*, 19(12), 1619-1627.
- Mo, J., Enkhjargal, B., Travis, Z. D., Zhou, K., Wu, P., Zhang, G., ... ve Zhang, J. H. (2019). "AVE 0991 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via Mas/PKA/CREB/UCP-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats". *Redox Biology*, 20, 75-86.
- Mohr JP, Ksitler JP, Zabramski JM. (2005). "Intracranial aneurysms". In: Bornett JM, Mohr JP, Stein BM, Yatmu FM (Ed.). *Newyork: Diagnosis and Management*:120-33.

- More, S. V., Kumar, H., Kang, S. M., Song, S. Y., Lee, K. ve Choi, D. K. (2013). “Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson’s disease”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Nichols, T. C., Fischer, T. H., Deliarhyris, E. N. ve Baldwin Jr, A. S. (2001). “Role of nuclear factor-kappa B (NF-κB) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis”. *Annals of Periodontology*, 6(1), 20-29.
- Nijhawan, D., Honarpour, N. ve Wang, X. (2000). “Apoptosis in neural development and disease”. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 73.
- Ning, B., Li, Z., Ning, L., Wu, J., Chen, X., Jiang, P., ... ve Zhao, B. (2021). “MSK1 downregulation is involved in inflammatory responses following subarachnoid hemorrhage in rats”. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(4), 1-8.
- Norbury, C. J. ve Hickson, I. D. (2001). “Cellular responses to DNA damage”. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367-401.
- O’Brate, A. ve Giannakakou, P. (2003). “The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?”. *Drug Resistance Updates*, 6(6), 313-322.
- Ostrowski, R. P., Colohan, A. R. ve Zhang, J. H. (2005). “Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(5), 554-571.
- Ovali, M. A. ve Uzun, M. (2017). “The effects of melatonin administration on KCNQ and KCNH2 gene expressions and QTc interval in pinealectomised rats”. *Cellular and Molecular Biology*, 63(3), 45-50.
- Ovesná, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T. ve Szekeres, T. (2006). “Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines”. *Oncology reports*, 16(3), 617-624.
- Oztopuz, O., Turkon, H., Buyuk, B., Coskun, O., Sehitoglu, M. H., Ovali, M. A. ve Uzun, M. (2020). “Melatonin ameliorates sodium valproate-induced hepatotoxicity in rats”. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 317-325.

- Öhman, J. (1990). "Hypertension as a risk factor for epilepsy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and surgery". *Neurosurgery*, 27(4), 578-581.
- Ökten, A. İ., Gezercan, Y. ve Ergün, R. (2006). "Traumatic subarachnoid hemorrhage: a prospective study of 58 cases". *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 12(2), 107-114.
- Pantoni, L., Sarti, C. ve Inzitari, D. (1998). "Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(4), 503-513.
- Park, S., Yamaguchi, M., Zhou, C., Calvert, J. W., Tang, J. ve Zhang, J. H. (2004). "Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Stroke*, 35(10), 2412-2417.
- Paul, R., Koedel, U., Winkler, F., Kieseier, B. C., Fontana, A., Kopf, M., ... ve Pfister, H. W. (2003). "Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis". *Brain*, 126(8), 1873-1882.
- Pawlowska, E., Szczepanska, J., Wisniewski, K., Tokarz, P., Jaskólski, D. J. ve Blasiak, J. (2018). "NF- $\kappa$ B-mediated inflammation in the pathogenesis of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage. Does autophagy play a role?". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1245.
- Pawlus, A. D., Sahli, R., Bisson, J., Rivière, C., Delaunay, J. C., Richard, T., ... ve Mérillon, J. M. (2013). "Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 501-511.
- Peng, L. Y., Yuan, M., Shi, H. T., Li, J. H., Song, K., Huang, J. N., ... ve Shen, H. Q. (2020). "Protective effect of piceatannol against acute lung injury through protecting the integrity of air-blood barrier and modulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation". *Frontiers in pharmacology*, 10, 1613.
- Peter, M. E. ve Krammer, P. H. (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis". *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 545-551.
- Pfohman, M. ve Criddle, L. M. (2001). "Epidemiology of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage". *Journal of Neuroscience Nursing*, 33(1), 39-39.

- Piotrowska, H., Kucinska, M. ve Murias, M. (2012). “Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol”. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(1), 60-82.
- Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. ve Kwiatkowska, K. (2015). “Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(3), 557-581.
- Pohl, F. ve Kong Thoo Lin, P. (2018). “The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: in vitro, in vivo and clinical trials”. *Molecules*, 23(12), 3283.
- Poisson, S. N., Glidden, D., Johnston, S. C. ve Fullerton, H. J. (2014). “Deaths from stroke in US young adults”, 1989–2009. *Neurology*, 83(23), 2110-2115.
- Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G. ve Ravichandran, K. S. (2014). “Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential”. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166-180.
- Pradilla, G., Chaichana, K. L., Hoang, S., Huang, J. ve Tamargo, R. J. (2010). “Inflammation and cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage”. *Neurosurgery Clinics*, 21(2), 365-379.
- Prunell, G. F., Mathiesen, T. ve Svendgaard, N. A. (2002). “A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage”. *Neuroreport*, 13(18), 2553-2556.
- Prunell, G. F., Svendgaard, N. A., Alkass, K. ve Mathiesen, T. (2005a). “Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain”. *Journal of Neurosurgery*, 102(6), 1046-1054.
- Prunell, G. F., Svendgaard, N. A., Alkass, K. ve Mathiesen, T. (2005b). “Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage”. *Neurosurgery*, 56(5), 1082-1092.

- Qian, C., Jin, J., Chen, J., Li, J., Yu, X., Mo, H. ve Chen, G. (2017). “SIRT1 activation by resveratrol reduces brain edema and neuronal apoptosis in an experimental rat subarachnoid hemorrhage model”. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9627-9635.
- Qian, Y., Lu, X., Chen, L., Sun, J., Cao, K., Yu, Q. ve Shao, J. (2021). “Effect of astaxanthin on neuron damage, inflammatory factors expressions and oxidative stress in mice with subarachnoid hemorrhage”. *American Journal of Translational Research*, 13(11), 13043.
- Rass, V. ve Helbok, R. (2019). “Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage”. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 19(10), 1-9.
- Reed, J. C. (1996). “Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease”. *Behring Institute Mitteilungen*, (97), 72-100.
- Reed, J. C. (1997). “Double identity for proteins of the Bcl-2 family”. *Nature*, 387(6635), 773-776.
- Reed, J. C. (2000). “Mechanisms of apoptosis”. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415-1430.
- Rinkel, G. J., Wijndicks, E. F., Vermeulen, M., Hasan, D., Brouwers, P. J. ve van Gijn, J. (1991). “The clinical course of perimesencephalic nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage”. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 29(5), 463-468.
- Rivière, C., Papastamoulis, Y., Fortin, P. Y., Delchier, N., Andriamanarivo, S., Waffo-Teguo, P., ... ve Monti, J. P. (2010). “New stilbene dimers against amyloid fibril formation”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(11), 3441-3443.
- Rodríguez-Rodríguez, A., Egea-Guerrero, J. J., de Azúa-López, Z. R. ve Murillo-Cabezas, F. (2014). “Biomarkers of vasospasm development and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage”. *Journal of the Neurological Sciences*, 341(1-2), 119-127.

- Rosciszewski, G., Cadena, V., Murta, V., Lukin, J., Villarreal, A., Roger, T. ve Ramos, A. J. (2018). "Toll-like receptor 4 (TLR4) and triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM-2) activation balance astrocyte polarization into a proinflammatory phenotype". *Molecular Neurobiology*, 55(5), 3875-3888.
- Roshak, A. K., Jackson, J. R., McGough, K., Chabot-Fletcher, M., Mochan, E. ve Marshall, L. A. (1996). "Manipulation of distinct NF $\kappa$ B proteins alters interleukin-1 $\beta$ -induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation". *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31496-31501.
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W. ve Szekeres, T. (2008). "Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?". *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(1-2), 68-94.
- Savarraj, J., Parsha, K., Hergenroeder, G., Ahn, S., Chang, T. R., Kim, D. H. ve Choi, H. A. (2018). "Early brain injury associated with systemic inflammation after subarachnoid hemorrhage". *Neurocritical Care*, 28(2), 203-211.
- Sawada, M., Suzumura, A. ve Marunouchi, T. (1992). "TNF $\alpha$  induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia". *Brain Research*, 583(1-2), 296-299.
- Schievink, W. I., Mokri, B., Michels, V. V. ve Piepgras, D. G. (1991). "Familial association of intracranial aneurysms and cervical artery dissections". *Stroke*, 22(11), 1426-1430.
- Schmedtje, J. F., Ji, Y. S., Liu, W. L., DuBois, R. N. ve Runge, M. S. (1997). "Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells". *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 601-608.
- Schwartz, A. Y., Masago, A., Sehba, F. A. ve Bederson, J. B. (2000). "Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model". *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 161-167.
- Scott, R. B., Eccles, F., Molyneux, A. J., Kerr, R. S., Rothwell, P. M. ve Carpenter, K. (2010). "Improved cognitive outcomes with endovascular coiling of ruptured intracranial aneurysms: neuropsychological outcomes from the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT)". *Stroke*, 41(8), 1743-1747.



- Sehba, F. A., Hou, J., Pluta, R. M., & Zhang, J. H. (2012). "The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Progress in Neurobiology*, 97(1), 14-37.
- Sercombe, R., Dinh, Y. R. T., & Gomis, P. (2002). "Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage". *The Japanese Journal of Pharmacology*, 88(3), 227-249.
- Setoguchi, Y., Oritani, Y., Ito, R., Inagaki, H., Maruki-Uchida, H., Ichiyanagi, T. ve Ito, T. (2014). "Absorption and metabolism of piceatannol in rats". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2541-2548.
- Seyed, M. A., Jantan, I., Bukhari, S. N. A. ve Vijayaraghavan, K. (2016). "A comprehensive review on the chemotherapeutic potential of piceatannol for cancer treatment, with mechanistic insights". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 725-737.
- Shao, A. W., Wu, H. J., Chen, S., Ammar, A. B., Zhang, J. M. ve Hong, Y. (2014). "Resveratrol attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory/MMP-9 pathway". *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20(2), 182.
- Shen, X., Yuan, G., Li, B., Cao, C., Cao, D., Wu, J., ... ve Chen, G. (2022). "Apelin-13 attenuates early brain injury through inhibiting inflammation and apoptosis in rats after experimental subarachnoid hemorrhage". *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2107-2118.
- Sherchan, P., Lekic, T., Suzuki, H., Hasegawa, Y., Rolland, W., Duris, K., ... ve Zhang, J. H. (2011). "Minocycline improves functional outcomes, memory deficits, and histopathology after endovascular perforation-induced subarachnoid hemorrhage in rats". *Journal of Neurotrauma*, 28(12), 2503-2512.
- Shi, L., Al-Baadani, A., Zhou, K., Shao, A., Xu, S., Chen, S. ve Zhang, J. (2017). "PCMT1 ameliorates neuronal apoptosis by inhibiting the activation of MST1 after subarachnoid hemorrhage in rats". *Translational Stroke Research*, 8(5), 474-483.
- Shishodia, S. ve Aggarwal, B. B. (2002). "Nuclear factor- $\kappa$ B activation: a question of life or death". *BMB Reports*, 35(1), 28-40.

- Simon, M. ve Grote, A. (2021). “Interleukin 6 and aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A narrative review”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4133.
- Solomon, R. A., Antunes, J. L., Chen, R. Y., Bland, L. I. N. D. A. ve Chien, S. (1985). “Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model”. *Stroke*, 16(1), 58-64.
- Sozen, T., Tsuchiyama, R., Hasegawa, Y., Suzuki, H., Jadhav, V., Nishizawa, S. ve Zhang, J. H. (2009). “Role of interleukin-1 $\beta$  in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice”. *Stroke*, 40(7), 2519-2525.
- Söderholm, M., Zia, E., Hedblad, B. ve Engström, G. (2014). “Leukocyte count and incidence of subarachnoid haemorrhage: a prospective cohort study”. *BMC Neurology*, 14(1), 1-7.
- Sun, C., Enkhjargal, B., Reis, C., Zhang, T., Zhu, Q., Zhou, K., ... ve Zhang, J. H. (2019). “Osteopontin-enhanced autophagy attenuates early brain injury via FAK–ERK pathway and improves long-term outcome after subarachnoid hemorrhage in rats”. *Cells*, 8(9), 980.
- Suzuki, H., Fujimoto, M., Kawakita, F., Liu, L., Nakatsuka, Y., Nakano, F., ... ve Shiba, M. (2020). “Tenascin-C in brain injuries and edema after subarachnoid hemorrhage: findings from basic and clinical studies”. *Journal of Neuroscience Research*, 98(1), 42-56.
- Suzuki, H., Hasegawa, Y., Kanamaru, K. ve Zhang, J. H. (2010). “Mechanisms of osteopontin-induced stabilization of blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats”. *Stroke*, 41(8), 1783-1790.
- Suzuki, J. ve Ohara, H. (1978). “Clinicopathological study of cerebral aneurysms: origin, rupture, repair, and growth”. *Journal of Neurosurgery*, 48(4), 505-514.
- Suzuki, K. ve Izumi, M. (2015). “The incidence of hemorrhagic stroke in Japan is twice compared with western countries: the Akita stroke registry”. *Neurological Sciences*, 36(1), 155-160.
- Sykes, S. M., Mellert, H. S., Holbert, M. A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W. S. ve McMahon, S. B. (2006). “Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction”. *Molecular Cell*, 24(6), 841-851.

- Tahara, K., Kim, H. D., Jin, J. J., Maxwell, J. A., Li, L. ve Fukuchi, K. I. (2006). "Role of toll-like receptor signalling in A $\beta$  uptake and clearance". *Brain*, 129(11), 3006-3019.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. ve Gu, W. (2006). "Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis". *Molecular Cell*, 24(6), 827-839.
- Teng, F., Yin, Y., Guo, J. ve Jiang, M. (2020). "Calpastatin peptide attenuates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(4), 2433-2440.
- Trump, B. F., Berezsky, I. K., Sato, T., Laiho, K. U., Phelps, P. C. ve DeClaris, N. (1984). "Cell calcium, cell injury and cell death". *Environmental Health Perspectives*, 57, 281-287.
- Tsai, T. H., Chang, C. H., Lin, S. H., Su, Y. F., Tsai, Y. C., Yang, S. F. ve Lin, C. L. (2021). "Therapeutic effect of and mechanisms underlying the effect of miR-195-5p on subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm and brain injury in rats". *PeerJ*, 9, e11395.
- Turan, N., Miller, B. A., Heider, R. A., Nadeem, M., Sayeed, I., Stein, D. G. ve Pradilla, G. (2017). "Neurobehavioral testing in subarachnoid hemorrhage: a review of methods and current findings in rodents". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(11), 3461-3474.
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B. ve Kiening, K. L. (2004). "Edema and brain trauma". *Neuroscience*, 129(4), 1019-1027.
- Üçler, N., Yüçetaş, Ş. C., Kılınç, S. ve Sarıca, C. (2017). "Subaraknoid kanama: toplumsal sonuçlar".
- Vallée, B. (1998). "Subarachnoid hemorrhage syndrome and its aneurysmal etiology. From Morgagni to Moniz, Dott and Dandy. A historical overview". *Neurochirurgie*, 44(2), 105-110.
- Veelken, J. A., Laing, R. J. ve Jakubowski, J. (1995). "The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats". *Stroke*, 26(7), 1279-1284.

- Vellimana, A. K., Aum, D. J., Diwan, D., Clarke, J. V., Nelson, J. W., Lawrence, M., ... ve Zipfel, G. J. (2020). "SIRT1 mediates hypoxic preconditioning induced attenuation of neurovascular dysfunction following subarachnoid hemorrhage". *Experimental Neurology*, 334, 113484.
- Velthuis, B. K., Rinkel, G. J., Ramos, L. M., Witkamp, T. D., Berkelbach van der Sprenkel, J. W., Vandertop, W. P. ve Van Leeuwen, M. S. (1998). "Subarachnoid hemorrhage: aneurysm detection and preoperative evaluation with CT angiography". *Radiology*, 208(2), 423-430.
- Visser-Meily, J. A., Rhebergen, M. L., Rinkel, G. J., van Zandvoort, M. J. ve Post, M. W. (2009). "Long-term health-related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relationship with psychological symptoms and personality characteristics". *Stroke*, 40(4), 1526-1529.
- Wahdan, S. A., Azab, S. S., Elsherbiny, D. A. ve El-Demerdash, E. (2019). "Piceatannol protects against cisplatin nephrotoxicity via activation of Nrf2/HO-1 pathway and hindering NF- $\kappa$ B inflammatory cascade". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(11), 1331-1345.
- Wan, Y., Song, M., Xie, X., Chen, Z., Gao, Z., Wu, X., ... ve Chen, M. (2021). "BMSCs regulate astrocytes through TSG-6 to protect the blood-brain barrier after subarachnoid hemorrhage". *Mediators of Inflammation*.
- Wang, D., Zhang, Y., Zhang, C., Gao, L. ve Li, J. (2019b). "Piceatannol pretreatment alleviates acute cardiac injury via regulating PI3K-Akt-eNOS signaling in H9c2 cells". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 886-891.
- Wang, F., Chen, H. Z., Lv, X. ve Liu, D. P. (2013b). "SIRT1 as a novel potential treatment target for vascular aging and age-related vascular diseases". *Current Molecular Medicine*, 13(1), 155-164.
- Wang, B. ve Li, J. (2020a). "Piceatannol suppresses the proliferation and induced apoptosis of osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR pathway". *Cancer management and research*, 12, 2631.

- Wang, K. J., Zhang, W. Q., Liu, J. J., Cui, Y. ve Cui, J. Z. (2020b). "Piceatannol protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via the Sirt1/FoxO1 signaling pathway". *Molecular Medicine Reports*, 22(6), 5399-5411.
- Wang, X., Wang, Z., Wu, J., Wang, L., Li, X., Shen, H., ... ve Chen, G. (2022). "Thioredoxin 1 regulates the pentose phosphate pathway via ATM phosphorylation after experimental subarachnoid hemorrhage in rats". *Brain Research Bulletin*.
- Wang, Y. C., Wang, P. F., Fang, H., Chen, J., Xiong, X. Y. ve Yang, Q. W. (2013a). "Toll-like receptor 4 antagonist attenuates intracerebral hemorrhage-induced brain injury". *Stroke*, 44(9), 2545-2552.
- Wang, Y., Liu, Y., Li, Y., Liu, B., Wu, P., Xu, S. ve Shi, H. (2019a). "Protective effects of astaxanthin on subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury: Reduction of cerebral vasospasm and improvement of neuron survival and mitochondrial function". *Acta Histochemica*, 121(1), 56-63.
- Wąsik, A. ve Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). "The mechanism of neuroprotective action of natural compounds". *Pharmacological Reports*, 69(5), 851-860.
- Weir, B. K., Kongable, G. L., Kassell, N. F., Schultz, J. R., Truskowski, L. L. ve Sigrest, A. (1998). "Cigarette smoking as a cause of aneurysmal subarachnoid hemorrhage and risk for vasospasm: a report of the Cooperative Aneurysm Study". *Journal of Neurosurgery*, 89(3), 405-411.
- Wen, J., Lin, H., Zhao, M., Tao, L., Yang, Y., Xu, X., ... ve Weng, D. (2018). "Piceatannol attenuates D-GalN/LPS-induced hepatotoxicity in mice: Involvement of ER stress, inflammation and oxidative stress". *International Immunopharmacology*, 64, 131-139.
- Wilkins, R. H. (1981). "Update—subarachnoid hemorrhage and saccular intracranial aneurysms". *Surgical Neurology*, 15(2), 92-101.

- Wong, G. K. C., Lam, S., Ngai, K., Wong, A., Mok, V., Poon, W. S. ve Cognitive Dysfunction after Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage Investigators. (2012). "Evaluation of cognitive impairment by the Montreal cognitive assessment in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: prevalence, risk factors and correlations with 3 month outcomes". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(11), 1112-1117.
- Wong, W. W. L. ve Puthalakath, H. (2008). "Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway". *IUBMB Life*, 60(6), 390-397.
- Wu, C. H., Tsai, H. P., Su, Y. F., Tsai, C. Y., Lu, Y. Y. ve Lin, C. L. (2022). "2-PMAP Ameliorates Cerebral Vasospasm and Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage by Regulating Neuro-Inflammation in Rats". *Cells*, 11(2), 242.
- Wu, C. H., Tsai, Y. C., Tsai, T. H., Kuo, K. L., Su, Y. F., Chang, C. H., ve Lin, C. L. (2021). "Valproic acid reduces vasospasm through modulation of akt phosphorylation and attenuates neuronal apoptosis in subarachnoid hemorrhage rats". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5975.
- Wu, Q., Qi, L., Li, H., Mao, L., Yang, M., Xie, R., ... ve Sun, B. (2017). "Roflumilast reduces cerebral inflammation in a rat model of experimental subarachnoid hemorrhage". *Inflammation*, 40(4), 1245-1253.
- Wu, U. I., Mai, F. D., Sheu, J. N., Chen, L. Y., Liu, Y. T., Huang, H. C. ve Chang, H. M. (2011). "Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis". *Journal of Pineal Research*, 50(2), 159-170.
- Wu, W., Guan, Y., Zhao, G., Fu, X. J., Guo, T. Z., Liu, Y. T., ... ve Li, Y. Q. (2016). "Elevated IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients". *Molecular Neurobiology*, 53(5), 3277-3285.
- Xia, D. Y., Yuan, J. L., Jiang, X. C., Qi, M., Lai, N. S., Wu, L. Y. ve Zhang, X. S. (2021). "Sirt1 promotes m2 microglia polarization via reducing ros-mediated Nlrp3 inflammasome signaling after subarachnoid hemorrhage". *Frontiers in Immunology*, 12.

- Xiao, X., Sun, S., Li, Y., Cen, X., Wu, S., Lu, A., ... ve Li, S. (2022). “Geniposide attenuates early brain injury by inhibiting oxidative stress and neurocyte apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats”. *Molecular Biology Reports*, 1-9.
- Xie, Z., Huang, L., Enkhjargal, B., Reis, C., Wan, W., Tang, J., ... ve Zhang, J. H. (2018). “Recombinant netrin-1 binding UNC5B receptor attenuates neuroinflammation and brain injury via PPAR $\gamma$ /NF $\kappa$ B signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats”. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 190-202.
- Xu, P., Tao, C., Zhu, Y., Wang, G., Kong, L., Li, W., ... ve Hu, W. (2021a). “TAK1 mediates neuronal pyroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage”. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1-18.
- Xu, W., Yan, J., Ocak, U., Lenahan, C., Shao, A., Tang, J., ... ve Zhang, J. H. (2021b). “Melanocortin 1 receptor attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism via AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway in rats”. *Theranostics*, 11(2), 522.
- Yadigaroğlu M. (2018). “Subaraknoid Kanama Şüphesi Olan Hastalarda Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Düzeyinin Tanı ve Prognozdeki Yeri”, *Uzmanlık Tezi*, s;3-22.
- Yan, J. H., Khatibi, N. H., Han, H. B., Hu, Q., Chen, C. H., Li, L., ... ve Zhou, C. M. (2012). “p53-induced uncoupling expression of aquaporin-4 and inwardly rectifying K<sup>+</sup> 4.1 channels in cytotoxic edema after subarachnoid hemorrhage”. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(4), 334-342.
- Yan, J., Chen, C., Hu, Q., Yang, X., Lei, J., Yang, L., ... ve Zhou, C. (2008). “The role of p53 in brain edema after 24 h of experimental subarachnoid hemorrhage in a rat model”. *Experimental Neurology*, 214(1), 37-46.
- Yan, J., Hitomi, T., Takenaka, K., Kato, M., Kobayashi, H., Okuda, H., ... ve Koizumi, A. (2015). “Genetic study of intracranial aneurysms”. *Stroke*, 46(3), 620-626.
- Yan, W., Fang, Z., Yang, Q., Dong, H., Lu, Y., Lei, C., ve Xiong, L. (2013). “SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(3), 396-406.

- Yang, C., Li, T., Xue, H., Wang, L., Deng, L., Xie, Y., ... ve Li, G. (2019). "Inhibition of necroptosis rescues SAH-induced synaptic impairments in hippocampus via CREB-BDNF pathway". *Frontiers in Neuroscience*, 12, 990.
- Ye, S. M. ve Johnson, R. W. (2001). "Regulation of interleukin-6 gene expression in brain of aged mice by nuclear factor  $\kappa$ B". *Journal of Neuroimmunology*, 117(1-2), 87-96.
- Yin, D., Zhou, S., Xu, X., Gao, W., Li, F., Ma, Y., ... ve Zhang, J. (2018b). "Dexmedetomidine attenuated early brain injury in rats with subarachnoid haemorrhage by suppressing the inflammatory response: The TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and the NLRP3 inflammasome may be involved in the mechanism". *Brain Research*, 1698, 1-10.
- Yin, J., Li, R., Liu, W., Chen, Y., Zhang, X., Li, X., ... ve Duan, C. (2018a). "Neuroprotective effect of protein phosphatase 2A/tristetraprolin following subarachnoid hemorrhage in rats". *Frontiers in Neuroscience*, 12, 96.
- You, W., Zuo, G., Shen, H., Tian, X., Li, H., Zhu, H., ... ve Wang, Z. (2016). "Potential dual role of nuclear factor-kappa B in experimental subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury in rabbits". *Inflammation Research*, 65(12), 975-984.
- Yu, Z. Q., Jia, Y., & Chen, G. (2014). "Possible involvement of cathepsin B/D and caspase-3 in deferoxamine-related neuroprotection of early brain injury after subarachnoid haemorrhage in rats". *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(3), 270-283.
- Yuksel, S., Tosun, Y. B., Cahill, J. ve Solaroglu, I. (2012). "Early brain injury following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: emphasis on cellular apoptosis". *Turkish Neurosurgery*, 22(5).
- Zacharia, B. E., Hickman, Z. L., Grobelny, B. T., DeRosa, P., Kotchetkov, I., Ducruet, A. F. ve Connolly, E. S. (2010). "Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Neurosurgery Clinics*, 21(2), 221-233.
- Zaremba, J. ve Losy, J. (2004). "Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke". *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 38(1 Suppl 1), S57-62.



- Zhang, X. S., Li, W., Wu, Q., Wu, L. Y., Ye, Z. N., Liu, J. P., ... ve Hang, C. H. (2016a). "Resveratrol attenuates acute inflammatory injury in experimental subarachnoid hemorrhage in rats via inhibition of TLR4 pathway". *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1331.
- Zhang, X. S., Wu, Q., Wu, L. Y., Ye, Z. N., Jiang, T. W., Li, W., ... ve Hang, C. H. (2016b). "Sirtuin 1 activation protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats". *Cell Death & Disease*, 7(10), e2416-e2416.
- Zhang, X., Wu, Q., Zhang, Q., Lu, Y., Liu, J., Li, W., ... ve Hang, C. (2017). "Resveratrol attenuates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage via inhibition of NLRP3 inflammasome activation". *Frontiers in Neuroscience*, 11, 611.
- Zhang, Y., Yang, X., Ge, X. ve Zhang, F. (2019a). "Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 726-733.
- Zhang, Y., Zhang, L. H., Chen, X., Zhang, N. ve Li, G. (2018). "Piceatannol attenuates behavioral disorder and neurological deficits in aging mice via activating the Nrf2 pathway". *Food & Function*, 9(1), 371-378.
- Zhang, Z. H., He, W. Z., Zhou, X. M. ve Zhang, X. (2022). "Metformin mitigates early brain injury after subarachnoid hemorrhage primarily by increasing SIRT1 and inhibiting inflammation factors."
- Zhang, Z., Zhao, G., Liu, L., He, J., Darwazeh, R., Liu, H., ... ve Sun, X. (2019b). "Bexarotene exerts protective effects through modulation of the cerebral vascular smooth muscle cell phenotypic transformation by regulating PPAR $\gamma$ /FLAP/LTB4 after subarachnoid hemorrhage in rats". *Cell Transplantation*, 28(9-10), 1161-1172.
- Zhao, W., Ujue, H., Tamano, Y., Akimoto, K., Hori, T. ve Takakura, K. (1999). "Sudden death in a rat subarachnoid hemorrhage model". *Neurologia Medico-chirurgica*, 39(11), 735-743.

- Zhou, C. H., Wang, C. X., Xie, G. B., Wu, L. Y., Wei, Y. X., Wang, Q., ... ve Shi, J. X. (2015). "Fisetin alleviates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats possibly by suppressing TLR 4/NF- $\kappa$ B signaling pathway". *Brain Research*, 1629, 250-259.
- Zhou, C., Yamaguchi, M., Colohan, A. R. ve Zhang, J. H. (2005). "Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(5), 572-582.
- Zhou, N., Xu, T., Bai, Y., Prativa, S., Xu, J. Z., Li, K., ... ve Yan, J. H. (2013). "Protective effects of urinary trypsin inhibitor on vascular permeability following subarachnoid hemorrhage in a rat model". *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(9), 659-666.
- Zhou, X. M., Zhang, X., Zhang, X. S., Zhuang, Z., Li, W., Sun, Q., ... ve Zhou, M. L. (2014a). "SIRT1 inhibition by sirtinol aggravates brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage". *Journal of Neuroscience Research*, 92(6), 714-722.
- Zhou, X. M., Zhou, M. L., Zhang, X. S., Zhuang, Z., Li, T., Shi, J. X. ve Zhang, X. (2014b). "Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model". *Journal of Surgical Research*, 189(1), 159-165.
- Zhou, X. Y., Sun, J. Y., Wang, W. Q., Li, S. X., Li, H. X., Yang, H. J., ... ve Han, J. X. (2022b). "TAT-HSP27 Peptide Improves Neurologic Deficits via Reducing Apoptosis After Experimental Subarachnoid Hemorrhage". *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 149.
- Zhou, Y., Khan, H., Hoi, M. P. M. ve Cheang, W. S. (2022a). "Piceatannol Protects Brain Endothelial Cell Line (bEnd. 3) against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress". *Molecules*, 27(4), 1206.
- Zhou, Y., Wang, S., Li, Y., Yu, S. ve Zhao, Y. (2018). "SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling promotes mitochondrial functional recovery and reduces apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats". *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 443.

- Zhu, Q., Enkhjargal, B., Huang, L., Zhang, T., Sun, C., Xie, Z., ... ve Zhang, J. H. (2018). "Aggf1 attenuates neuroinflammation and BBB disruption via PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway after subarachnoid hemorrhage in rats". *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1-13.
- Zou, W., Song, Y., Li, Y., Du, Y., Zhang, X. ve Fu, J. (2018). "The role of autophagy in the correlation between neuron damage and cognitive impairment in rat chronic cerebral hypoperfusion". *Molecular Neurobiology*, 55(1), 776-791.
- Zubkov, A. Y., Lewis, A. I., Scalzo, D., Bernanke, D. H. ve Harkey, H. L. (1999). "Morphological changes after percutaneous transluminal angioplasty". *Surgical Neurology*, 51(4), 399-403.

**EKLER**  
**EK 1**  
**ETİK KURUL ONAY FORMU**



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

**Karar Tarihi** : 30.10.2020

**Karar No** : 2020/09

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

TOPLANTI TARİHİ	:30.10.2020
TOPLANTI SAYISI	:2020/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	:2020- E.2000168654
KARAR NUMARASI	:2020/09-03
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:Yüksek Lisans Öğr. Gülfem ERBİL
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	: <i>Wistar cinsi erkek rat, 27+15 adet</i>

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Metehan UZUN, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Deneysel Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Piseatannolün Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğunu; oybirliği ile karar verilmiştir.