



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL İSKEMİK İNME MODELİNDE
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA KARŞI SİNAPİN
TİYOSİYANAT VE/VEYA SİNAPİK ASİT ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet Bilgehan BİLGE
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yaşar ŞAHİN

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender YARSAN

KIRIKKALE-2024



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL İSKEMİK İNME MODELİNDE
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA KARŞI SİNAPİN
TİYOSİYANAT VE/VEYA SİNAPİK ASİT ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Ahmet Bilgehan BİLGE
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yaşar ŞAHİN

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender YARSAN

**Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından
2023/131 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

KIRIKKALE-2024

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- o Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- o Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- o Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- o Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- o Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ahmet Bilgehan BİLGE

22.07.2024

ÖZET

DENEYSEL İSKEMİK İNME MODELİNDE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA KARŞI SİNAPİN TİYOSİYANAT VE/VEYA SİNAPİK ASİT ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yaşar ŞAHİN

Ortak Danışman: Prof. Dr. Ender YARSAN

Temmuz 2024, 63 sayfa

İnme; günlük hayatın artan stres düzeyi, beslenme alışkanlıklarının bozulması ve günlük hareket miktarının azalmasına bağlı olarak gelişebilen, insanlarda ve hayvanlarda yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sahip olan bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı; iskemik inme modelinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı sinapin tiyosiyanat ve/veya sinapik asit'in etkileri araştırılmasıdır. Çalışmada; 56 Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Çalışma; Sham grubu, SA grubu (40 mg/kg SA), ST grubu (40 mg/kg ST) ve SA+ST grubu (40 mg/kg SA, 40 mg/kg ST), CCA grubu (iskemi/reperfüzyon), CCA+SA grubu (iskemi/reperfüzyon, 40 mg/kg SA, IP), CCA+ST grubu (iskemi/reperfüzyon, 40 mg/kg ST, IP), CCA+SA+ST grubu (iskemi/reperfüzyon, 40 mg/kg SA, 40 mg/kg ST, IP) olmak üzere 8 gruba (n:7) ayrıldı. Bu gruplardan; Sham grubu, SA grubu, ST grubu ve SA+ST grubuna madde uygulandıktan 3 saat sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edildi. CCA (sağ ana karotis arter iskemi), CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarındaki hayvanlar anestezi altında sağ ortak karotis arter klemplenecek inme oluşturuldu. İnme oluşturulan gruplardaki hayvanlara inmeden 60 dakika sonra intraperitoneal yolla madde uygulandı. İskemik inme oluşturulan gruplar; ilk 90 dakikalık inme süresi tamamlandıktan sonra sağ ana karotis arterdeki klemp açılarak iskemi/reperfüzyon hasarı oluşumu sağlandı. Reperfüzyondan 2,5 saat sonra; CCA, CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarındaki hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Bütün gruplardaki hayvanların beyin dokusu çıkarıldı. Beyin dokusunda; TAS (total antioksidan durum), TOS (total oksidan durum), OSİ (oksidatif stres indeksi), MDA (Malondialdehit), GSH (glutasyon peroksidaz), GFAP (gliyal fibriler asidik protein) ve NSE (nöron spesifik enolaz) düzeyleri belirlendi. Ayrıca beyin dokusunun histopatolojik inceleme ve dejeneratif nöronların yüzdesi belirlendi. CCA grubunda OSI değeri diğer çalışma gruplarına kıyasla yüksek bulundu ($p<0,001$). CCA grubunda kıyasla CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında OSI değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$). MDA

değeri; kontrol grubuna kıyasla CCA grubunda anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$). Diğer alışma gruplarına kıyasla NSE ve GFAP düzeyleri CCA grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$). CCA grubunda kıyasla CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında NSE düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$). GFAP düzeyi, CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında, CCA grubuna göre istatistiksel açıdan azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Beyin korteksinde dejeneratif piramidal nöronların yüzdesi diğer gruplara kıyasla CCA grubunda istatistiksel olarak arttığı bulundu ($p<0,001$). Bu CCA grubundaki dejeneratif nöron yüzdesindeki artış, tedavi grupları olan CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında anlamlı bir Şekilde azaldığı gözlendi ($p<0,001$). Sonuç olarak, SA, ST ve SA+ST uygulaması sıçanlarda serebral IR hasarı üzerinde önemli bir önleyici etkiye sahip olduğu bulundu. Bu bileşiklerin serebral IR hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin çeşitli mekanizmalar ve doz-yanıt çalışmaları ile araştırılmasına odaklanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: GFAP, İnme, iskemi/reperfüzyon hasarı, NSE, oksidatif stres, sinapik asit, sinapin tiyosiyanat,

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SINAPINE THIOCYANATE AND/OR SINAPIC ACID AGAINST ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN AN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE MODEL

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Pharmacology and Toxicology (Veterinary), Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yaşar ŞAHİN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ender YARSAN

July 2024, 63 pages

Stroke is a disease that can develop due to the increased stress level of daily life, deterioration of eating habits, and decreased daily activity, and has a high rate of morbidity and mortality in humans and animals. The purpose of this study; is to investigate the effects of sinapine thiocyanate and/or sinapic acid against ischemia/reperfusion injury in an ischemic stroke model. In the study, 56 Sprague-Dawley rats were used. In the study, they were divided into 8 groups (n:7): Sham group, SA group (40 mg/kg SA), ST group (40 mg/kg ST), and SA+ST group (40 mg/kg SA, 40 mg/kg ST), CCA group (ischemia/reperfusion), CCA +SA group (ischemia/reperfusion, 40 mg/kg SA, IP), CCA+ST group (ischemia/reperfusion, 40 mg/kg ST, IP), and CCA+SA+ST group (ischemia/reperfusion, 40 mg/kg SA, 40 mg/kg ST). From these groups, animals under anesthesia were sacrificed 3 hours after the substance was applied to the Sham group, SA group, ST group, and SA+ST group. Animals in the CCA, CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST groups were stroked by clamping the right common carotid artery under anesthesia. The substance was administered intraperitoneally to the animals in the stroke-induced groups 60 minutes after the stroke. Groups created for ischemic stroke: After the first 90 minutes of stroke were completed, the clamp on the right common carotid artery was opened to ensure ischemia/reperfusion injury. 2.5 hours after reperfusion, animals in the CCA, CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST groups were sacrificed under anesthesia. Brain tissue of animals in all groups was removed. The brain tissue of animals in all groups was removed. In brain tissue; TAS, TOS, OSI, MDA, GSH, GFAP, and NSE levels were determined. Additionally, the histopathological examination of brain tissue and the percentage of degenerative neurons were determined. The OSI value was found to be higher in the CCA group compared to other study groups ($p<0.001$). Compared to the CCA group, the OSI value decreased statistically significantly in the CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST groups ($p<0.001$). MDA value; It increased significantly in the CCA group compared to the

control group ($p < 0.001$). Compared to other study groups, NSE and GFAP levels were found to be significantly higher in the CCA group ($p < 0.001$). Compared to the CCA group, the NSE level decreased statistically significantly in the CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST groups ($p < 0.001$). It was observed that GFAP levels decreased statistically in the CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST groups compared to the CCA group ($p < 0.001$). The percentage of degenerative pyramidal neurons in the cerebral cortex was found to be statistically increased in the CCA group compared to the other groups ($p < 0.001$). It was observed that the increase in the percentage of degenerative neurons in this CCA group decreased significantly in the treatment groups CCA+SA, CCA+ST, and CCA+SA+ST ($p < 0.001$). In conclusion, SA, ST, and SA+ST administrations were found to have a significant preventive effect on cerebral IR injury in rats. The focus should be on investigating the protective effect of these compounds on cerebral IR injury through various mechanisms and dose-response studies.

Key Words: GFAP, stroke, ischemia/reperfusion injury, NSE, oxidative stress, sinapic acid, sinapine thiocyanate.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin süresince çalışmamın her aşamasında bilgi, deneyim ve zamanını benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yaşar ŞAHİN'e, ayrıca ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a, çalışma süresi boyunca bilgileri ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e, Sayın Prof. Dr. Ebru YILDIRIM'a, Sayın Doç. Dr. Hidayet TUTUN'a, Sayın Doç. Dr. Efe KURTDEDE'ye, Sayın Arş. Gör. Sena YILMAZ'a yine bu süreç boyunca tecrübelerinden ve desteklerinden faydalandığım Vet. Hek. Evrim Özgen ÜNLÜ'ye ve ayrıca aileme çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Beyin Anatomisi	2
1.2. Beyin Histoloji	3
1.3. İnme.....	4
1.4. İnme Çeşitleri	6
1.4.1. İskemik İnme	6
1.4.2. Hemorajik İnme	7
1.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı	7
1.5.1. İskemi.....	8
1.5.2. Reperfüzyon.....	9
1.6. Oksidatif Stres	10
1.6.1. Serbest Radikal	11
1.6.2. Antioksidanlar	11
1.7. Nöron Spesifik Enolaz.....	12
1.8. Glial Fibriler Asidik Protein	13
1.9. Sinapin Tiyosiyonat.....	13
1.10. Sinapik Asit	14
2. MATERYAL ve YÖNTEM	16
2.1. Demirbaş ve Sarf Malzemeler	16
2.2. Deney Hayvanı ve Etik Kurulu Kararı	17
2.3. Deney Hayvanlarının Barınma Koşulları	17

2.4. Hayvan Deneyi Tasarımı ve Cerrahi Prosedür	17
2.5. Biyokimyasal Yöntemler	20
2.5.1. Doku Homojenizasyonu	20
2.5.2. Bradford Yöntemi ile Doku Protein Miktarı Tayini	21
2.5.3. TOS Düzeyinin Belirlenmesi	21
2.5.4. TAS Düzeyinin Belirlenmesi	21
2.5.5. OSİ (Oksidatif Stres İndeksi)	21
2.5.6. MDA Düzeyinin Belirlenmesi	22
2.5.7. Total Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi	22
2.5.8. Glial Fibriler Asidik Protein Analizi	22
2.5.9. Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Analizi	23
2.6. Histopatolojik Yöntem	24
2.7. İstatistiksel Analizler	26
3. BULGULAR	27
3.1. Biyokimyasal Bulgular	27
3.1.1. Beyin Dokusu Oksidan-Antioksidan Düzeyleri	27
3.1.2. Beyin Dokusu NSE ve GFAP Düzeyleri	28
3.2. Histopatolojik Bulgular	29
4. TARTIŞMA	43
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sarf Malzeme Listesi.....	16
2.2. Cihaz Listesi.....	16
2.3. Hayvan Deneyi Tasarımı.....	18
3.1. Çalışma gruplarının beyin dokusu oksidan-antioksidan düzeyleri	28
3.2. Çalışma gruplarının beyin dokusu NSE ve GFAP düzeyleri	28
3.3. Grupların histopatolojik skor ve Dejeneratif nöron yüzdesi sonuçları	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Deneysel cerrahi prosedürü.....	19
2.2. Sağ Ortak karotis arter iskemi/reperfüzyonu	20
3.1. Kontrol grubunda beyin korteksi görüntüsü	30
3.2. Kontrol grubunda hipokampüs görüntüsü.....	31
3.3. Kontrol grubunda beyincik görüntüsü	31
3.4. CCA grubunda beyin korteksin görüntüsü.....	32
3.5. CCA grubunda hipokampüs görüntüsü	32
3.6. CCA grubunda beyincik görüntüsü.....	33
3.7. CCA+ST grubunda beyin korteksinin görüntüsü.....	33
3.8. CCA+ST grubunda hipokampüs görüntüsü.....	34
3.9. CCA+ST grubunda beyincik görüntüsü.....	34
3.10. CCA+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü	35
3.11. CCA+SA grubunda hipokampüs görüntüsü.....	35
3.12. CCA+SA grubunda beyincik görüntüsü	36
3.13. CCA+ST+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü	36
3.14. CCA+ST+SA grubunda hipokampüs görüntüsü.....	37
3.15. CCA+ST+SA grubunda beyincik görüntüsü	37
3.16. ST grubunda beyin korteksi görüntüsü	38
3.17. ST grubunda hipokampüs görüntüsü	38
3.18. ST grubunda beyincik görüntüsü.....	39
3.19. SA grubunda beyin korteksi görüntüsü.....	39
3.20. SA grubunda hipokampüs görüntüsü	40
3.21. ST grubunda beyincik görüntüsü	40
3.22. ST+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü.....	41
3.23. ST+SA grubunda hipokampüs görüntüsü	41
3.24. ST+SA grubunda beyincik görüntüsü.....	42

KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
CAPE	Caffeic Acid phenyl Ester
CCA	Sağ Ana Karotis Arter
DALY	Özürllüğe Göre Düzeltmiş Yaşam Yılları
ENO2	Enolaz 2 Geni
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GİA	Geçici İskemik Atak
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
H2O2	Hidrojen Peroksit
HE	Hematoksilen Eozin
IR	İskemik Reperfüyon
kDa	KiloDalton
LAİ	Laküner İnfarklar
MDA	Malondialdehit
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NO	Nitrik Oksit
NSE	Nöron Spesifik Enolaz
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PADİ	Parsiyel Anterior Dolaşım İnfarktları
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SA	Sinapik Asit
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
ST	Sinapin Tiyosiyanat
TADİ	Total Anterior Dolaşım İnfarktları
TAS	Total Antioksidan Durum
TBI	Travmatik Beyin Hasarı
TOS	Total Oksidan Durum

1. GİRİŞ

İnme; insan ve hayvanlarda yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sahip en önemli hastalıkların başında gelmektedir (Arnold ve ark 2020, Li ve Zhang 2021). Gelişmiş ülkeler arasında kabul edilen ABD’de yapılan çalışmada; her 2 dakikada 3 kişinin felç geçirdiği bildirilmiş ve yaşam boyunca felç riskinin yaklaşık %8- %10 olduğu tahmin edilmektedir. Bu veriler hastalığın ne kadar yaygın olduğunun ve ciddiyetinin göstergesidir (Sommer 2017, Woodruff ve ark 2011). Felç sonrasında beyinde hasar başlıca, eksitotoksisite, iyonik dengesizlik, oksidatif stres, nitratif stres, apoptozis, asidotoksisite, peri-infarkt depolarizasyonu ve inflamasyona bağlı birden çok etkenin karmaşık etkileşimi neticesinde meydana gelmektedir (Doyle ve Ark, 2008). 1970’li yılların sonrasında, doku hasarına sebebiyet veren mekanizmaların tanımlanması ve felç durumlarına yeni tedavi yöntemlerinin temelini atılması için iskemi hayvan modelleri üzerinde çalışmalar başlamıştır. Günümüzde bu çalışmalarda; domuzlar, koyunlar, tavşanlar, fareler ve ratlar gibi hayvanlar kullanılmaktadır. Özellikle bu hayvanların iskemik inme modelleri için uygun olmaları, bakım, besleme, tedarik olanaklarının kolay ve ucuz olması, fizyolojik ve patolojik değişikliklerin hızlı takip edilebilmesi, daha büyük memeli hayvanlar bu çalışmalarda büyük önemi olsa dahi, küçük hayvanları bu çalışmalarda daha ayrıcalıklı kılmaktadır (Bacigaluppi ve Ark. 2010, Sommer 2017).

Akut serebral inme vakalarının yaklaşık olarak %85 besleyici arteriyel damarların tıkanması, %15’ lik bir oranın ise ilgili damarların yırtılması neticesinde gerçekleştiği bilinmektedir (Sommer 2017). Damar tıkanıklıkları, oksijenin ve enerjinin yetersiz gelmesine, sonrasında reaktif oksijen türlerinin açığa çıkmasına, glutamat salınımına, hücrenin içinde kalsiyum birikmesine ve inflamatuvar süreçlerinin indüklenmesi gibi birçok olayın gerçekleşmesine neden olmaktadır (Fluri ve ark. 2015).

İnme durumu çeşitli genetik faktörler ve çevresel şartlardan dolayı oluşabilen karmaşık yapılı bir hastalıktır. Düşük yoğunluğa sahip proteinlerin arterlerin duvarlarında toplanması neticesinde (Hiperkolesterolemi), arteriyel hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, yaşa ve genetik durum gibi çeşitli sebeplere bağlı olarak risk

faktörü artış göstermektedir (Bacigaluppi ve ark. 2010). Kesin tanının konulması için beyin ve nörovasküler görüntüleme sistemleri kullanılmalıdır. Yaygın olması sebebi ile en çok kullanılan yöntem bilgisayarlı tomografidir (BT). Bu yöntem ile hemorajik inme vakalarında %95 doğruluk oranı ile tanı konulabilir. Bu yöntemde teşhis oranı iskemi durumlarında daha düşüktür. Yine tanı için kullanılan bir diğer cihaz ise Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) cihazıdır. Geçici iskemik atak ve minör felçte gözlemlenen küçük hacimli iskemi durumlarında MRG daha yüksek duyarlılığa sahiptir (Musuka ve ark. 2015).

Genel olarak iskemik inme durumlarında, rekanalizasyon (reperfüzyon) ve nöroproteksiyon tedavi seçenekleri iki başlıkta değerlendirilmektedir. Rekanalizasyon bir kan damarının daralması ya da tamamen tıkanması neticesinde sekteye uğrayan kan akışının yeniden sağlanmasıdır. Nöroproteksiyon ise beyin dokusunda meydana gelen hasarı azaltmak ya da önlemek için uygulanan bir yöntemdir. Şu an için rekombinant doku tipi plazminojen aktivatörü olan alteplaz, akut iskemik felç için onaylanmış tek tedavi yöntemidir. Hayvan inme modellerinde çalışılan ve olumlu etkileri olduğu saptanan 700'ün üzerinde maddenin arasında sadece serbest radikalleri azaltıcı bir ajan olan NXY-059 maddesi faz 3 aşamasında pozitif sonuçlar vermiş ve etkinliğini kanıtlamıştır (Durukan ve Tatlısumak 2007). Özellikle son yıllarda hayvanlar üzerinde iskemik inme çalışmaları artmakla birlikte, bitkisel ve takviye edici gıdaların iskemik inmeye karşı koruyucu ve önleyici etkisi araştırılmaktadır. Bu tezin amacı SA, ST ve SA+ST'nin serebral IR (İskemi reperfüzyon) modelinde koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesidir.

1.1. Beyin Anatomisi

Beyin, diğer organlarda da olduğu gibi metabolik olarak ihtiyaç duyduğu glukoz ve oksijen gibi maddeleri kılcak damarlar vasıtası ile karşılar (Karbowski 2011). Bu süreçte temelde kullanılan damarların yaklaşık %90'ı karotid arter kalan %10 luk kısmı ise vertebral arterlerdir. Beyin dokusuna ulaşan oksijen ve glukoz maddeleri elektrofizyolojik işlevler ve bazal metabolizma faaliyetleri için kullanılır (Kılınçarslan 2019)

Çeşitli sıçan türlerinin serebral korteks mikrodamarlarında yapılan ölçümler neticesinde RBC akış hızının ortalama 0,39- 2,08 mm/sn arasında ve genellikle 1

mm/sn olduğu bildirilmiştir (Unekawa ve ark, 2010). Yine wistar albino ve sprague dawley sıçanlarda yapılan bir araştırmada serebral kan akışı sonuçları, çok fazlı pCASL ile 109 ± 22 , 111 ± 18 ve 100 ± 15 mL/100 g/dak ve otoradyografi ile 108 ± 12 , 116 ± 14 ve 122 ± 16 mL/100 g/dak olarak bulunmuştur (Larkin ve ark., 2019).

Arcus aortada 3 büyük atardamar çıkmaktadır. Bunlar arteria brachialis, sol arteria karotis ve sol subklavyan atardamardır. Arcus aortadan çıkan ilk büyük dal arteria brachialistir. Arteria brachialisten ileri doğru çıkan ilk dal sol arteria karotistir; daha sonra sağ ana arteria karotise dallanır (Cochran, 2011). Arcus aortikadan çıkan ana arterler asimetriktir: Solda iki arter vardır, sol ortak karotis arter ve sol subklavyen arter ve sağda sadece bir tane brakiosefalik arter vardır (Low ve ark, 2016). Karotid arterler, elastik yapıya sahip arterler arasından yer almaktadır (Treuting ve ark, 2018). Vagus siniri, boynun her iki yanında yer alan karotid arterlerle bitişik seyretmektedir. Vena jugularis interna, trakeanın yakınında sol ana karotid arterin yanında yer alır ve beyni drene etmektedir. Vena jugularis interna, vagus siniri ve ortak karotid arterler medialde laringeal sinirler ve servikal sempatik trunkusların bulunduğu karotis kılıfında yer almaktadır. Ventralde ise ortak karotid arterler sternotiroid kaslar tarafından örtülür. Her iki ortak karotid arter tiroid bezi seviyesinde bölünerek internal ve eksternal karotid arterleri oluşturur. Oksipital arter kafatasının kaudal/dorsal tarafındaki kasları ve deriyi beslemektedir. İkinci kısım kulağa dikey olarak uzanmaktadır ve üç dal vermektedir (Maynard, ve Downes, 2019).

1.2. Beyin Histolojisi

Merkezi sinir sistemi sırası ile kranial kavite ve spinal kanalın içerisinde bulunan beyin ve spinal korddan meydana gelmektedir. Hücresel açıdan sinir dokuları ele alındığında ise nöron hücreleri ve destek hücreleri olmak üzere iki tip hücre ile karşılaşılır. Nöron hücreleri canlılığın sinir sisteminin fonksiyonel birimleridir. Nükleus barındıran hücre gövde yapısı ile uzunlukları değişkenlik göstermektedir. Sinaps adı verilen nöronlar arasında bilgi aktarımı sağlayan özelleşmiş temas noktaları vardır. Destek hücreleri ise konum olarak nöronlara yakın bulunan, iletim yapmayan hücrelerdir (Ross 2014).

Beyin bölümü içerisinde az miktarda beyaz madde olarak da bilinen substantia alba ile çevrili çekirdek olarak da isimlendirilen gri madde (substantia grisea) vardır. Her bir çekirdek bir ya da daha fazla sistemden sinirsel uyarı alır. Beyin içerisinde gri madde beyin korteksini ve beyincik korteksini meydana getiren bölüm çevresi boyunca bulunur. Gri madde ve beyaz madde histolojik açıdan beyaz maddenin perikarya bulundurmaması ve yoğun olarak miyelinli aksonlara sahip olması sebebi ile net olarak ayırt edilebilir (Samuelson 2007).

Beyin dokusundan enine alınan kesit sonrası piamater, moleküler katman, dış piramit hücreleri katmanı, iç piramit hücreleri katmanı ve multiform hücreler katmanları olmak üzere 5 katman gözlenecektir. Substansiya Alba katmanı Oligodendrosit, fibröz astrosit ve mikroglia hücreleri ile her yönde seyreden miyeline sahip sinir tellerinden oluşmuştur (Girgin 2016).

1.3. İnme

İnme; hem insanlarda hem de hayvanlarda yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sahip olan bir hastalıktır (Arnold ve ark 2020, Li ve Zhang 2021). Özellikle insanlarda dünya çapında meydana gelen ölümlerin, ilk nedenlerinden birisi inmedir (Fluri ve ark 2015). İnmenin görüldüğü vakalarda ilerleyen süreçte ölümle sonuçlanmasa dahi hafızanın daha zayıf olmasına bağlı olarak, bilişsel gerileme yaşanma ihtimalinin yüksek olduğu öne sürülmektedir (Mijajlović ve ark 2017).

Bu hastalık ölüm ve bilişsel bozukluğun yanında denge sağlayamama (An ve Shaughnessy 2011), yürümede bozulmalar (Kim ve ark 2021), üst ekstremit ve (Chan ve ark 2018), alt ekstremit fonksiyonlarında bozulmalar (Hong ve ark 2018) ve felç (Wang ve ark 2020) gibi durumlara da sebep vermektedir. Felç sonrasında fiziksel bozulmaların iyileşme eğilimi gösterdiği düşünülürken bilişsel hasarların kötüleşme eğilimi gösterdiği düşünülmektedir. Ek olarak bilişsel etkisi de tam anlamı ile aydınlatılamamıştır (Mijajlović ve ark 2017). Özellikle inme vakalarının yaygın olarak görülmesinde; diyabet, obezite gibi sağlık sorunları da etkili olabilmektedir (Jurcau ve Simion 2021). Genel olarak inme; beyine giden kanın akışında meydana gelen akut azalmaya bağlı olarak gelişmektedir ve bu durum sonucunda beyinde iskemik hasar, nörolojik defisitler görülmektedir (El-Koussy ve ark 2014). Beyinde meydana gelen hasar, iskemi/reperfüzyon yoluyla daha da artmaktadır. Zamana bağlı

olarak bu inmenin meydana getirdiği hasarın fizyo-patolojisi değişmektedir. Serebral iskemi/reperfüzyonun; akut fazında nörotransmitterin salınması, ATPaz yetersizliği, serebral kan akışında azalma gibi durumlar görölürken, subakut fazda ROS üretiminde artış, apoptoz, endotel hasarı gibi durumlar görölülebilmektedir (Jurcau ve Simion 2021).

İnme olgusu, intracranial vasküler bir durumdan kaynaklanan ve geleneksel olarak 24 saat (en az) devam eden klinik semptomları olan ani şekillenen fokal nörolojik yetmezliktir. Klinik semptomlar ilk gün kısa sürdüğu takdirde, durum geçici iskemik atak (GİA) olarak tanımlanır (Victor ve Ropper, 2001). Dokulara ulaşan kan akış miktarı standart hücresel işlevi devam ettirmek için yeterli düzeyde değilse iskemi vardır. Sekonder kan sızıntısının olması hemorajik enfarktüse sebep olabilir (Summers ve ark 1995). İskemik inme durumu, intrakranial arteriyel veya venöz tıkanmalara bağlı şekillenir. Hemorajik inme durumu ise, beyin içi kan damarlarının yırtılmasına bağlı şekillenir. İnsanlarda iskemik durumlar inme olgularının %77'sini, hemorajik olgular ise %23'ünü meydana getirir (Sacco ve ark 1998). Çalışmalar halen devam etse de köpeklerde de sıklık oranı paraleldir (Joseph ve Ark. 1988 , McConnell ve ark 2005).

Görülen inmelere karşı bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemleri yaygın olarak kullanılarak teşhis daha kolay yapılabilmektedir (El-Koussy ve ark 2014). Köpek gibi hayvanlarda görülen inme durumlarının teşhis edilmesi insanlara göre daha zordur (Arnold ve ark 2020). Son yıllarda gelişen teknolojiye paralel, inmenin aşamalarının belirlenmesinde ilerleme katedilmesine rağmen, inmeyi önemli ölçüde iyileştiren bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir (Przykaza 2021). Bu nedenle serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu veya tedavi edici maddelerin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmaktadır (Wang ve ark 2018, Zhao ve ark 2018, Chengve ark 2019, Fu ve ark 2021, Shi ve ark 2022). Yapılan deney hayvanı modelleri ile inmelere karşı yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için çalışmalar yapılmalıdır (Li ve Zhang 2021).

Sinapın maddesi, kuarterner amin alkaloid olan ve turpgil ailesine mensup bitkilerde sıkça bulunan bir maddedir. Farmakolojik açıdan çeşitli etkilere sahiptir (Guo ve ark 2016). Sinapın sıkça organik asit maddeleri, glikozitler, organik asitler, amidler, esterler ve tiyosiyanatlarla birleşim sağlar (Bhinu ve ark 2009). Sinapın tiyosiyanat (ST) maddesi, *Semen Raphani'nde* bulunmakta olan sinapinin temel aktif

bileşenidir. Yapılan çalışmalar neticesinde, ST'nin kan basıncını azaltmakta mutlak bir rolü olduğunu ve etki mekanizmasının, vasküler endotel hücrelerince adezyon faktörlerinin salgılanımını inhibe etmek ve inflamasyonun oluşumunu baskılamak ile alakalı olduğunu ortaya koymuştur (Li ve ark 2015).

ST, pıhtılaşma ile alakalı etkenlerin ekspresyonunu düşürerek düzenleyebilir, bunun sonucunda vasküler inflamatuvar harabiyetin sebep olduğu protrombotik durumu baskılayabilir (Li ve ark 2017). Bunun yanında geçmişte yapılan çalışmalar, sinapinin serbest radikalleri temizleyebilen, yaşlanma durumunu yavaşlatan (Qun ve Ruiqi 1999) ve iltihap önleyici özelliği olan (Zhang ve Shen 1996) doğal antioksidan bir madde olduğunu kanıtlamıştır. Sinapik asit; baharatlarda, narenciye, sebzelerde, tahıllarda ve yağlı tohum ürünlerinde yaygın olarak bulunan ve oral olarak biyoyararlı bir fitokimyasaldır ve antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanser, antimutajenik, antiglisemik, nöroprotektif ve antibakteriyel aktiviteler sahiptir (Chen 2016). Dünya genelinde her geçen gün kullanımı artan bitkisel ve takviye edici gıdaların; çoğu hastalığa karşı koruyucu ve önleyici etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmada; sıçanlarda serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı sinapik asidin ve sinapine thiocyanate'ın etkileri araştırılacaktır.

1.4. İnme Çeşitleri

1.4.1. İskemik İnme

İskemik inme Dünya Sağlık Örgütü tarafınca 2006 senesinde sadece vasküler nedenlere bağlı olarak kısa sürede yerleşip global ya da fokal serebral işlevlerin bozulmasına neden olan 1 gün veya daha uzun süre devam edebilen, ölümlü sonuçlanma ihtimali de bulunan bir durumdur (WHO 2006).

Esas olarak trombus veya emboliye bağlı kan akımının bozulmasından kaynaklanır (Frizzell, 2005). Akut inmede, merkezi santral bölgede kan akımının azaldığı ve dokuların hızla nekroza doğru ilerlediği durumlarda, çevre bölgelerde kan akımının azaldığı ancak doku ölümünün henüz başlamadığı sessiz bir bölge vardır ve bu bölgeye "penumbra" denir. Akut tedavi aynı zamanda hala iyileştiği ve geri döndürülebilir olduğu bu alanı korumak için temel amaçtır. Nörolojik defisitler, serebral kan akımının sağladığı bölgeye bağlı olarak ortaya çıkar. Serebral kan akımının bozulmasını takip eden dönemde ilk olarak nörolojik fonksiyon kaybı, artan

süre ile anoksiye bağılı serebral enfarktüsler gözlenir (Mozaffarian, vd., 2016). İskemik inme durumlarında nörolojik belirtilerin şiddeti ve etkilenen bölge, süre ile doğru orantılıdır. Bamford ve arkadaşları 1991 yılında PADİ, TADİ, PDİ, LAİ olarak klinik neticelerine göre sınıflandırma yapmıştır (Küpeli, 2019). Ancak bu sınıflandırmada sadece klinik bulgular göz önünde bulundurulup, etiyoloji dikkate alınmamıştır.

1.4.2. Hemorajik İnme

Hemorajik inme, beyni besleyen damarların yapısal olarak bozulması sonucu oluşan kanamalara bağılı olarak, travmaya yol açmadan gelişir. Kanama beyin dokusuna yöneliktir ve inme tiplerinin %20'sini oluşturur, bu da daha az görülmekle birlikte daha ağır bir tabloya neden olur (Sacco 2013). Hemorajik inmede hematoma neden olduğu kitle etkisi ana hasar nedenidir ve bu nedenle kafa içi basıncında artışa neden olur. Bu işlem sırasında bu basınca bağılı olarak nekroz gelişir. Yüksek tansiyon en yaygın nedenlerden biridir. Lezyon yerine göre subaraknoid hemoraj ve intraserebral hemoraj alt başlıklarıdır. Subaraknoid kanama subaraknoid kanal yönünde yerleşir ve esas olarak anevrizmalardan kaynaklanır. Mortalite oranı yüksektir ve alkol, sigara, uyuşturucu kullanımı veya yüksek tansiyon gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin önlenmesi bu oranı azaltmada önemli bir etkiye sahiptir. Ani bir başlangıcı vardır ve klinik belirtiler şiddetli baş ağrısı, kusma veya bilinç kaybını içerebilir. İntraserebral kanama esas olarak spontan olgularda mikroanevrizmalara bağılı küçük derin arter lokalizasyonlarında ortaya çıkar. Travma, tümörler veya vaskülitler diğer nedenler olarak ortaya çıkabilir. Klinik bulgular subaraknoid kanama ile benzerdir (Şahin, 2015). Çoğu hastada ani bilinç kaybı ile koma gelişir. Yüksek mortalite oranına rağmen, hasta hastalığın üstesinden gelebiliyorsa motor fonksiyonda olumlu bir iyileşme gözlenir (Küpeli, 2019). Hemorajik inme vakaları insanlarda yüksek insidansa sahip olmasına rağmen, özellikle köpeklerde nadir olduğu düşünülmektedir (Garosi 2010).

1.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

İskemi, bir organı besleyen arterlerde ki kan akış miktarının kısmen ya da tamamen kesilmesi sonucunda oluşur. İskemik bölgede bulunan hücre ve dokular daha önce gerçekleştirdikleri aerobik metabolizma faaliyetlerini artık gerçekleştiremedikleri

için anaerobik metabolizma ile ihtiyaç duydukları enerjiyi karşılamaya çalışırlar. Anaerobik metabolizma ile üretilen metabolitler, kan akımı olmadığı için dokularda birikir ve kan akımı normale döndüğünde (reperfüzyon) metabolitlerin uğradığı oksidasyonu ile açığa çıkan maddeler dolaşım sistemine karışır ardından kanla birlikte bütün vücuda yayılır (Kahraman, 2014).

İskemi ve reperfüzyon hasarında durum, minimal geçici hasar ile kalıcı doku nekrozuna varacak kadar geniş aralıkta sonuçlanabilir. İskemi ve reperfüzyon hasarında kesin mekanizma bilinmemekle birlikte, humoral ve hücrel kaskat sistemin hem pıhtılaşma hem de inflamatuvar ile ilişkili mekanizmalarını kullanan multifaktöriyel bir mekanizma ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (Albert vd., 2003).

Reperfüzyon lezyonları ile ilgili ilk araştırma 1973 yılında Hearse ve arkadaşları tarafınca yapılmıştır. Bu çalışmada oksijene bağımlı enzimlerin salgılanmasının iskemik sıçan kalplerinde reperfüzyon lezyonlarında kritik bir göreve sahip olduğu anlaşılmıştır (Hearse, 1973).

1.5.1. İskemi

İskemi, kan akımının yetersiz olması ve artık metabolizma yan ürünlerinin dolaşım yoluyla uzaklaştırılamaması nedeniyle dolaşım sisteminin dokuların ihtiyaç duyduğu oksijen ve diğer metabolitleri dolaşım yoluyla karşılayamaması olarak tanımlanmaktadır. Hipoksi ise dokulara ulaşan oksijen eksikliği olarak tanımlanabilir. Hipoksinin en yaygın nedenlerinden birisi iskemidir (Ballestín, vd., 2018). İskemi neticesinde oluşan hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile ilişkilidir. Ayrıca hücre tipine, yaralanmaya yatkınlığa, farklılaşmaya, kan talebine ve metabolizmaya bağlı değişiklik göstermektedir (Kahraman, 2014).

Uzun süreli doku iskemisi durumunda; İskeletteki hücre metabolizması ve hücre yapısı ile ilgili birçok değişiklikle hücrel şişlik, asidoz, hipoksantin düzeylerinin artması, hücre içi kalsiyum/sodyum oranının artması, adozin trifosfat (ATP)/ fosfokreatin ve glutatyon düzeylerinin azalması, membran potansiyelinde değişiklikler, adozin sinyal aktivitesinde artış, iskelet bütünlüğünde kayıp ve nükleotid fosfohidrolizi ortaya çıkar (Eltzschig, 2005).

Hipoksi ilk olarak mitokondrideki oksidatif fosforilasyon metabolizmasına etki ederek ATP ve fosfokreatin depolarının azalmasına yol açar. Sonuç olarak, ATP'ye bağımlı hücre diyaframlı pompalar işlevsiz hale gelir. Bu da hücre şişmesine yol

açar. Sonrasında, ribozomların granüler endoplazmik retikulumdan kopması ve polizomlardan monozomların oluşması ile protein sentezinde bir düşüş olur. Hipoksi düzelmezse, artmış membran geçirgenliği ve fosfolipid bakımından zengin yoğunluklar nedeniyle mitokondriyal fonksiyonun bozulması ve hücrel şişme ile karakterize morfolojik deformasyon gözlenir. Kritik iskemi süresi, doku canlılığını koruyabilen maksimum iskemi süresi şeklinde tanımlanır. İskeminin kritik evresi hücrenin metabolik aktivitesine ve adaptasyon mekanizmalarına bağlı olarak değişkenlik gösterse de canlıların uzun süre iskemiye maruz kalması sonucunda nekroz ve geri dönüşü olmayan hasar kaçınılmazdır. Meydana gelen dönüşümsüz hasarın en büyük belirtisi, doku oksijenasyonunun restorasyonuna rağmen hipoksi sonucu mitokondriyal disfonksiyon ve hücre zarı hasarının iyileştirilememesidir (Anaya-Prado ve Toledo-Pereyra 2002).

Geri dönüşü olmayan yaralanma mekanizmaları dört adettir. Membran fosfolipidlerinin kaybı: Hücre zarındaki fosfolipitler, artan bozunma ve azalan sentez nedeniyle azalır, hücre iskeleti anormallikleri: İskelet hücre zarının ayrılması ve yırtılması, kalsiyumla aktive olan hücre içi proteazların artması ve hücrenin şişmesi neticesinde ortaya çıkarlar. Bu hasar mekanizmaları ile, oksidatif fosforilasyon, hücre genetik yapısı, hücre zarının bütünlüğü ve protein sentez olmak üzere 4 ana sistem etkilenir (Kahraman, 2014).

1.5.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon çeşitli sebepler sonucu oluşan iskemiye uğramış, doku ve organların yeniden oksijenlenmesi ve beslenmesi olayıdır (Kalogeris ve ark 2012). Buna ek olarak iskemi meydana gelmiş hücrelerde antioksidatif ajan yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde artış meydana gelir (Wu ve ark. 2018). Reperfüzyon hasarı, iskemiden sonra dokularda yeniden meydana gelen kan akışına bağlı oluşan hasarlara denir (Akkoç 2008, Kalogeris ve ark 2012). Reperfüzyon hasarı, reperfüzyon döneminde yapılacak müdahalelere bağlı azaltılabilir ya da ortadan kaldırılabilir (Kalogeris ve ark 2012).

Günümüzde reperfüzyona bağlı gelişen hasarların altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamakla birlikte, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, endotel disfonksiyonu ve aşırı kalsiyum yüklenmesi gibi çeşitli faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İskemi/reperfüzyon tarafından oluşan hasarın boyutu iskemi ve

reperfüzyon süresine göre değişebilmektedir (Kalogeris ve ark 2012). Asıl hasara sebep olan reaksiyonlar reperfüzyon sırasında ortaya çıkar ve iskemik nedenlerden temel olarak farklıdır (Piper ve ark 2003). Kan akışının düşme oranı ve iskemi süresinin uzunluğu doğrudan hücrelerin fonksiyonel bozulma düzeyini, yaralanmanın boyutunu hatta ölümü belirler (Kalogeris ve ark 2016).

Özellikle reperfüzyon döneminde meydana gelen hücresel ölümlerin 72 saate kadar sürebileceği düşünülecek olursa reperperfüzyon sürecinde yapılabilecek terapötik müdahaleler ile hasar boyutu azaltılabilir (Kalogeris ve ark 2012).

İskemi ve reperfüzyon esnasında gerçekleşen patolojik durumların doku hasarını tetiklediği kabul edilmesi, kandaki düşüşün sebep olduğu hasarı azaltabilecek yeni sağaltım yollarının bulunması amacıyla iskemi/reperfüzyon hasarı ile ilgili çalışmalar artmıştır (Kalogeris ve ark 2016). 14-16 haftalık yaş aralığında ve 300-350 gr vücut ağırlığında olan dişi Wistar albino ratlarda bilateral olarak 1 saat süre ile klipslenen karotid arter sonrasında 1 saat süre ile salınarak reperfüzyon hasarı oluşması sağlanması (Demir 2019) ve yine Wistar albino ratlarda 15 dakika süre ile karotid arterin oklüzyonunu takiben hayvanın 1 gün süre ile reperfüzyona bırakılması yöntemleri deneysel olarak iskemi/reperfüzyon vakalarının araştırılması için kullanılan yöntemlerdendir (Toklu ve ark. 2015)

1.6. Oksidatif Stres

Hücre içinde enerjinin üretilmesi süreçlerinde kullanılan oksijen molekülü canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için büyük önem taşımaktadır. Yüksek oranda potansiyel zararı bulunan ve yüksek miktarda reaktif olan serbest oksijen radikalleri enerji oluşum prosesi doğal yan ürünüdür. Bu serbest radikallerin canlıda oluşum hızı ile bu radikallerin vücutta bertaraf edilme hızı arasında denge bulunmaktadır (Doğan Z. 2012). Bu denge bozulduğu ve absorbe edilen serbest radikal miktarı, oluşan serbest radikal miktarından daha fazla olduğu takdirde oksidatif stres meydana gelmiş olur (Fidancı 2023, Uludağ 2017). Hastalık patogenezi en önemli sebeplerden bir tanesi artan serbest radikal düzeyi neticesinde oluşan oksidatif strese bağlı hücrelerde hasar oluşmasıdır. Bu nedenle oksidatif stres, fertilité problemler, renal yetmezlikler, immun sistem sorunları, kalp rahatsızlıkları, sepsis, kanser hücresi oluşumu, kas hastalıkları, karaciğer hastalıkları

ve dejeneratif nörolojik hastalıklar gibi birçok rahatsızlığın oluşum etiolojisinden sorumlu tutulmakta ve yaşlandıkça oksidatif stres artmaktadır (Fidancı 2023, Cirak ve ark. 2003). Bunun yanında Oksidatif stres durumu, endotel hücrelerin aktive olmasına ve işlevlerinin bozulmasına da sebep olur (Yazır ve Dalçık, 2013).

1.6.1. Serbest Radikal

Dış yörüngesinde tek sayıda elektrona sahip bir atom veya moleküldür. Dış yörüngede ikiye bölünemeyen elektronların varlığı, atomu veya molekülü reaktif hale getirir. Bunlar stabil olmadıkları için çok kısa ömürlüdürler. Bölünmemiş elektronlara sahip oldukları için kararsızdırlar ve diğer moleküllerle çiftleşme ve kararlı hal alma eğilimi gösterirler. Çevremizdeki ve vücudumuzdaki fiziksel faktörler ve kimyasal süreçler serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Serbest oksijen radikalleri iskemi ve reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Reperfüzyon iskemi lezyonlarında, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) toksik SOR'lerin üretimini arttırdığı bilinmektedir. Bu oksijensiz radikaller birçok biyolojik molekülle reaksiyona girme eğilimindedir. Bu kimyasal çekim sonucu ortaya çıkan yıkıcı etki, antioksidan mekanizmalar ile ortadan kaldırılır. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutasyon ve E vitamini gibi antioksidanlar, vücudun oksidatif strese karşı savunma hattıdır. Oksidatif moleküllerin oluşum hızı ile antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulması oksidatif moleküllerin oluşumuna yol açar (Gutteridge, ve Halliwell, 2000).

Moleküler oksijenin, canlı organizmaların aerobik ortamındaki serbest radikallerin ana kaynağı olduğu bilinmektedir. Diğer serbest radikal kaynakları arasında NO (nitrik oksit), aktive nötrofiller, endoplazmik retikulum, mitokondriyal elektron taşıma sistemi, peroksizom ve plazma zarı bulunur. Aerobik koşullar altında, normal metabolizma sırasında oksijenin (O_2) %98'i suya (H_2O) indirgenir. Kalan %2'lik kısım süperoksit (O_2^\bullet) ve hidroksil radikallerine ($\bullet OH$) dönüştürülür (Kahraman, 2014).

1.6.2. Antioksidanlar

Antioksidan terimi oksidasyon oluşumunu engelleyen ya da gecikmesini sağlayan bileşen grubuna dahil maddeler için kullanılmaktadır. Antioksidanlar vücutta spesifik olarak lipit, DNA, protein ve karbonhidrat gibi fonksiyonel veya yapısal

moleküllerin zararlı etkilerini önleyen maddelerdir (Ekici ve Sağdıç 2008). Doğal antioksidan maddeler, ROS veya serbest radikallerin potansiyel zararlarına karşı koruyucu etki sağlarlar. (Koca ve Karadeniz 2005).

Bunun yanı sıra antioksidanlar, oksijenin tahrip edici reaksiyonunu karşısında koruyucu etkisi bulunan maddelerdir. Bu maddelerin antioksidan içerikleri ve bu içeriklerin biyoyararlanım oranları gıda maddelerinin cinsi, depolanması, üretim yöntemlerine göre değişiklik gösterir. Çeşitli nörodejeneratif rahatsızlıklarda önemli oranda kan-beyin bariyerini geçebilen antioksidan maddelere gerek duyulur (Yılmaz 2010, Keleştemur ve Özdemir 2011).

Organizmalar istenmeyen oksidan maddeler ile değişken yöntemler ile başa çıkmaya çalışırlar. Serbest radikallerin zararlarına karşı farklı korunma yöntemi bilinmektedir. Örneğin enzimler tarafınca oksidan moleküllerin güçsüz duruma getirilmesi ve oksijenle tepkime gerçekleştirerek veya oksidan maddenin yerini alarak bölgedeki oksijen yoğunluğunu düşürmeleri, oksidan maddelere bir adet hidrojen molekülü verilerek hidroksil radikali yapısında bulunan hidrojen atomlarıyla bağ kurabilecek yapıdaki ürünleri yok edip peroksidasyonun başlamasına engel olabilmeleri, serbest radikallerin sebep olduğu hasarları iyileştirebilmeleri, oksidan maddeleri bağlayarak işlevlerine engel olabilmeleri gibi yöntemler mevcuttur (Ekici ve Sağdıç 2008, Keleştemur ve Özdemir 2011).

Antioksidan maddeler işlevsellik yönünden ise radikaller veya oksidan maddeler ile tepkimeye girerek etki etme, enzimlerin inhibasyonu veya aktivasyonunu sağlama, prooksidan olarak görev alan metal katalistleri ile şelat oluşturma, zincirleme tepkimelerde serbest radikalleri bağlama ve diğer antioksidan maddelerin rejenerasyonunu sağlayarak etki gösterme gibi yeteneklere sahiptirler (Ekici ve Sağdıç 2008).

1.7. Nöron Spesifik Enolaz

ENO2 adlı gen tarafından kodlanan bu madde gama enolaz, enolaz 2 veya kısaca NSE olarak da bilinmektedir. Olgun nöron hücreleri ve nöroendokrin hücrelerinde homodimer olarak bulunan NSE'nin, travmatik beyin hasarı (TBI) durumlarında ve kemirgenlerde yüksek basınç patlama dalgası ile meydana gelen beyin hasarı hayvan modellerinde yükseldiği bildirilmiştir (Wang ve ark. 2018). Yapılan bir çalışmada

TBI olgularında parametre olarak değerlendirilen NSE düzeyinin farklı bir TBI parametresi olan S100B proteinine kıyasla daha belirgin şekilde olgu ile ilişkilendirilebileceği ve NSE erken yükselmelerinin (72 saate kadar) beyin ölümü durumunda kötüleşmeyi öngördüğü bildirilmiştir (Böhmer ve ark. 2011). Yine farklı bir çalışmada NSE' nin glial ve nöronal hücre ölümünde biyobelirteç olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Liu ve ark. 2015).

Bunun yanında TBI olgularında NSE'nin referans alınması ile alakalı en önemli dezavantaj kırmızı kan hücrelerinden de bolca eksprese edilmesidir. Bu durum çalışma yapılırken NSE ölçümlerinde hemoliz düzeltilmesi gerektirmektedir (Wang ve ark. 2018).

1.8. Glial Fibriler Asidik Protein

Kısaca GFAP olarak adlandırılır. En güvenilir TBI biyolojik belirteçleri olarak bilinir. Yoğunluklu olarak beyin dokusu yaralanmalarından sonra beyin omurilik sıvısı ve serum/ plazma gibi biyosıvılarda salınımı gerçekleşir. Şiddetli TBI olgularında beyin omurilik sıvısı ve serum/ plazmada 3- 34 saat içerisinde yükselir. GFAP için TBI durumu sonrasında yükselmesinin ciddiyete bağlı olduğuna dair ek kanıtlar bulunmaktadır (Wang ve ark. 2018). Yapılan bir çalışmada birincil patlama sonrası 6 saat içerisinde, serum GFAP seviyesinin belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir (Svetlov ve ark. 2012).

1.9. Sinapin Tiyosiyonat

Sinapin tiyosiyonat, bazı bitkilerde, özellikle hardal tohumu (Brassica türleri) gibi turpgillerden sebzelerin tohumlarında bulunan doğal bir bitki alkaloidi olan sinapin'den türetilen kimyasal bir bileşiktir. Sinapinin kendisi, sinapik asidin bir kolin esteridir. Bitkinin savunma mekanizmalarına katkıda bulunmak da dahil olmak üzere bitkide çeşitli görevleri vardır. Sinapinin, acı tadı ve potansiyel toksisitesi sayesinde, bitki otçullardan ve patojenlerden korunmuş olur. Ek olarak, antioksidan özelliklere sahiptir. Sinapin doğal bir bileşik olmasına ve türevlerinin birçoğunun çeşitli amaçlar için incelenmiş olmasına rağmen, spesifik özelliklerin ve etkilerin belirli bileşiğe ve bağlamına göre değişebileceğini belirtmek önemlidir (Yang ve Ark. 2023, Liu ve Ark. 2021, Wang, 2022).

Tiyosiyanat iyonunun insan vücudunda ki konsantrasyon düzeyi, çeşitli faktörlere bağlı olarak farklılık gösterir ve normal konsantrasyonları temel besinlerden gelir. Diğer taraftan tiyosiyanatın vücuttaki normal konsantrasyonları glikosinolet içeren şalgamlar, kıvırcık lahana, lahana ve inorganik tiyosiyanat içeren süt, peynir gibi temel yiyeceklerden gelmektedir (Özalp, 2007).

Tiyosiyanat, tiyosiyamik asitten türetilen kimyasal bir iyondur. Sinapın ile birleştirildiğinde sinapın tiyosiyanat oluşturur. Sinapın tiyosiyanatın özellikleri ve potansiyel kullanımları, spesifik özelliklerine bağlı olabilir ve farmasötikler veya kimyasal araştırmalar dahil olmak üzere çeşitli alanlarda uygulamaları vardır (Liu, vd., 2021; Wang, 2022).

1.10. Sinapik Asit

Sinapik asit, fenolik bir bileşik olup doğada birçok bitkide bulunur. Bu asit, özellikle Brassicaceae (lahana ailesi) bitkileri, turp, hardal ve keten gibi bitkilerde yaygın olarak bulunur. Ayrıca, sinapik asit, kahve, kepekli tahıllar ve bazı meyvelerde de izlenebilir. Sinapik asit barındırma düzeyi, farklı çavdar çeşitlerinde 0.07-0.14 µg/g arasında değişkenlik gösterebilir. Turunçgil ailesinde bulunan meyvelerde farklı miktarlarda sinapik asit [Limon (Citrus limon L.), kuru ağırlık bazında 72.1 µg/g; murcott portakal (C. reticulate, C. sinensis), kuru ağırlık bazında 50.1 µg/g] bulunmaktadır. Sinapik asit, çilek (450 µg/g) ve amerikan kızılıcıkları (210 µg/g) gibi kırmızı meyvelerin içinde de bulunur (Boz 2014, Coşkun 2022, Deveci ve Ark, 2016, Hameed, 2014). Çeşitli biyolojik etkileri vardır. Antioksidan özelliklere sahip olabilir ve bu özellikleri nedeniyle hücresel hasara karşı koruyucu olabilir. Ayrıca, antimikrobiyal özelliklere sahip olduğuna dair bazı araştırmalar bulunmaktadır. Özellikle bitkilerde savunma mekanizmalarına katılır ve ultraviyole (UV) ışığa karşı bir koruma sağlar (Dağlı, 2017). Sağlık açısından, sinapik asidin antioksidan özellikleri nedeniyle, araştırmacılar kanser, kalp hastalıkları ve diğer oksidatif stresle ilişkilendirilen durumlar üzerindeki potansiyel etkilerini incelemişlerdir. Ancak, bu konudaki araştırmalar devam etmektedir ve net sonuçlara varmak için daha fazla çalışma gerekmektedir (Dağlı, 2017). Antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuvar, kanser baskılayıcı ve kaygı giderici özellikler sergiler. (Boz, 2015). Sinapik asit (C₁₁H₁₂O₅), (3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit) serbest formda veya ester olarak bulunur. Kendiliğinden dimer oluşturabilir ve tahıl hücrelerinin duvarında

ferulik asit oluşturabilir. Gcl oksitleyici ajanlar ve gcl bazlar ile uyumlu olmadığı bilinir (Mattila ve Kumpulainen 2002).



2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Demirbaş ve Sarf Malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan cihaz ve sarf malzemeler Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de verildi.

Çizelge 2.1. Sarf Malzeme Listesi

Sarf Malzeme	Kod, Firma, Ülke
Sinapin Tiyosiyanat	HY-N0450, BLD Pharm, Çin
Sinapik Asit	A15683, Bostonchem, Çin
NSE Test Kiti	DZE201110542, Sunredbio, Çin
GFAP Test Kiti	DZE201110971, Sunredbio, Çin
TOS Test Kiti	Cat No: RL0024, Relassay, Türkiye
TAS Test Kiti	Cat No: RL0017, Relassay, Türkiye
Total Glutasyon Kiti	Cat No: Otto3053, Otto Scientific, Türkiye
Ketamin (Ketasol %10)	Vetviva Richter GMBH, Avusturya
Xylazine (Xylazinbio %2)	Bioveta A.S, Çek Cumhuriyeti
Formaldehit Solüsyonu (%10 tamponlu)	Cas No: 50-00-0, Tekkim, Türkiye
Serum Fizyolojik	AD0160E, Turkfleks, Türkiye
Hematoksilen Eozin	Lot No: 27713, Scytek, ABD
Ksilol Solüsyonu	Cas No: 1330-20-7, Isolab, Almanya

Çizelge 2.2. Cihaz Listesi

Cihazlar	Markalar
Elisa Reader	Tecan Austria GmbH 5082 Grödig, Austria
Işık Mikroskobu	CHK2-F-GS, Japonya
Dijital Terazı	Precisa XB 220A
Mikrofotograf	Olympus Corporation, Japonya
Işık Mikroskobu	Olympus CX41 Model
Santrifüj Cihazı	Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen
Otomatik Pipet	Eppendorf Research® Plus
Buzdolabı	Beko BK 9610 NM
Derin Dondurucu	Beko 7043 MB
Doku Takip Cihazı	Leica ASP300S; Leica Microsystem, Almanya
Doku Gömme Cihazı	Leica Microsystem, Almanya
Tam Otomatik Leica 2155 Rotary Mikrotom	Leica Microsystem, Almanya
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1202, Japonya

2.2. Deney Hayvanı ve Etik Kurulu Kararı

Tez çalışması için, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin ve onay (Karar no:2023/06-23) alındı. Çalışmada kullanılan hayvanlar 8-12 haftalık ve 250-300 gram vücut ağırlıklı 56 erkek Sprague-Dawley sıçan olup, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Biyokimyasal analizler; Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Histopatolojik incelemeler; Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

2.3. Deney Hayvanlarının Barınma Koşulları

Çalışmada kullanılan hayvanların; laboratuvar adaptasyonu (14 gün) ve cerrahi prosedürleri Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Hayvanlar, 12 saat süre aydınlık ve 12 saat süre karanlık, ısı ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) takipli odalarda tutuldu, *ad libitum* (sıçan pelet yemi ve su) olarak beslendi.

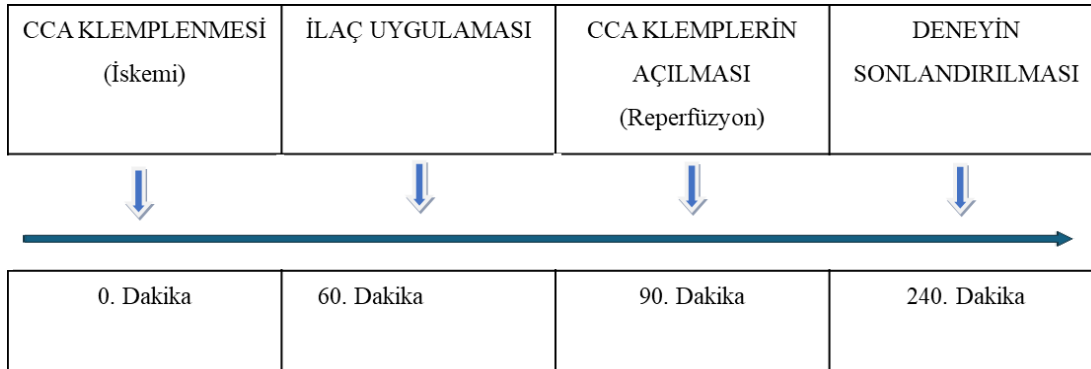
2.4. Hayvan Deneyi Tasarımı ve Cerrahi Prosedür

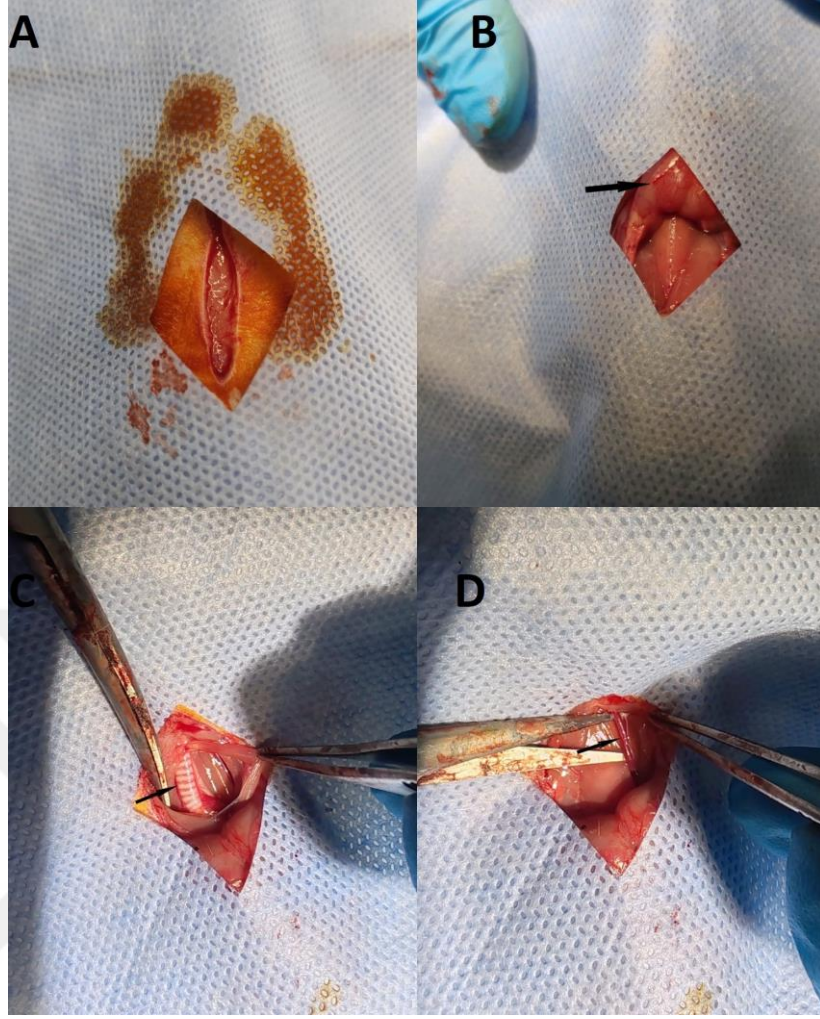
Çalışmanın hayvan deneyi tasarımı Çizelge 2.3.'de verildi. Çalışmada kullanılan hayvanlar, hayvan refahı dikkate alınacak şekilde rastgele kafeslere yerleştirildi ve her bir grupta yedi hayvan olacak şekilde gruplandırıldı. Kontrol grubunda yer alan sıçanlara intraperitoneal yolla serum fizyolojik uygulandı ve 3 saat sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu çıkarıldı. Sinapik Asit (SA, Cas no 530-59-6, Lot no 82335944-D3) grubunda yer alan sıçanlara intraperitoneal yolla sinapik asit (40 mg/kg) uygulandı ve 3 saat sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu çıkarıldı (Shahid ve ark., 2018, Unsal ve ark., 2021B). Sinapin tiyosiyanat (ST, Cas no 7431-77-8, Lot no CMC644) grubunda yer alan sıçanlara intraperitoneal yolla sinapin tiyosiyanat (40 mg/kg) uygulandı ve 3 saat sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu çıkarıldı (Wang ve ark. 2022, Guan ve ark., 2022). SA+ST grubunda yer alan sıçanlara intraperitoneal yolla SA (40 mg/kg) ve ST (40 mg/kg) uygulandı ve 3 saat sonra anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu çıkarıldı.

Sağ Ortak karotis arter (CCA), CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarındaki hayvanlar, genel anestezi (Xylazine 10 mg/kg ve Ketamin 90 mg/kg intraperitoneal) uygulandıktan sonra: ratların boyun bölgesi ön-orta hat üzerinden toraksa kadar tıraş edildi. İşlem bölgesi dezenfekte edildikten sonra, orta hattın insizyonu açıldı. Yüzeysel mikrodiseksiyon yapılarak dokular açıldı, trakea gözlemlendikten sonra paratrakeal kasların arasından sağ ana karotis arterine erişildi. Sağ ana karotis arter klemplenecek şekilde “iskemik inme” modeli oluşturuldu. Hayvanlar üzerine yapılan cerrahi prosedürler Şekil 2.1. ve Şekil 2.2’de verildi.

İskemik inme oluşturulan gruplardan; CCA grubundaki hayvanlar inmeden 60 dakika sonra intraperitoneal yolla serum fizyolojik uygulandı. CCA+SA grubundaki hayvanlar inmeden 60 dakika sonra intraperitoneal yolla SA (40 mg/kg) uygulandı. CCA+ST grubundaki hayvanlar inmeden 60 dakika sonra intraperitoneal yolla ST (40 mg/kg) uygulandı. CCA+SA+ST grubundaki hayvanlar inmeden 60 dakika sonra intraperitoneal yolla SA (40 mg/kg) + ST (40 mg/kg) uygulandı. İskemik inme oluşturulan gruplar; İlk 90 dakikalık inme süresi tamamlandıktan sonra sağ ana karotis arterdeki klempten çıkarılarak iskemi/reperfüzyon hasarı oluşumu sağlandı. Reperfüzyondan sonra ratlar 2,5 saat takip edildi ve anestezi altındaki hayvanlar sakrifiye edilip beyin dokusu çıkarıldı (Turkmen ve ark. 2016).

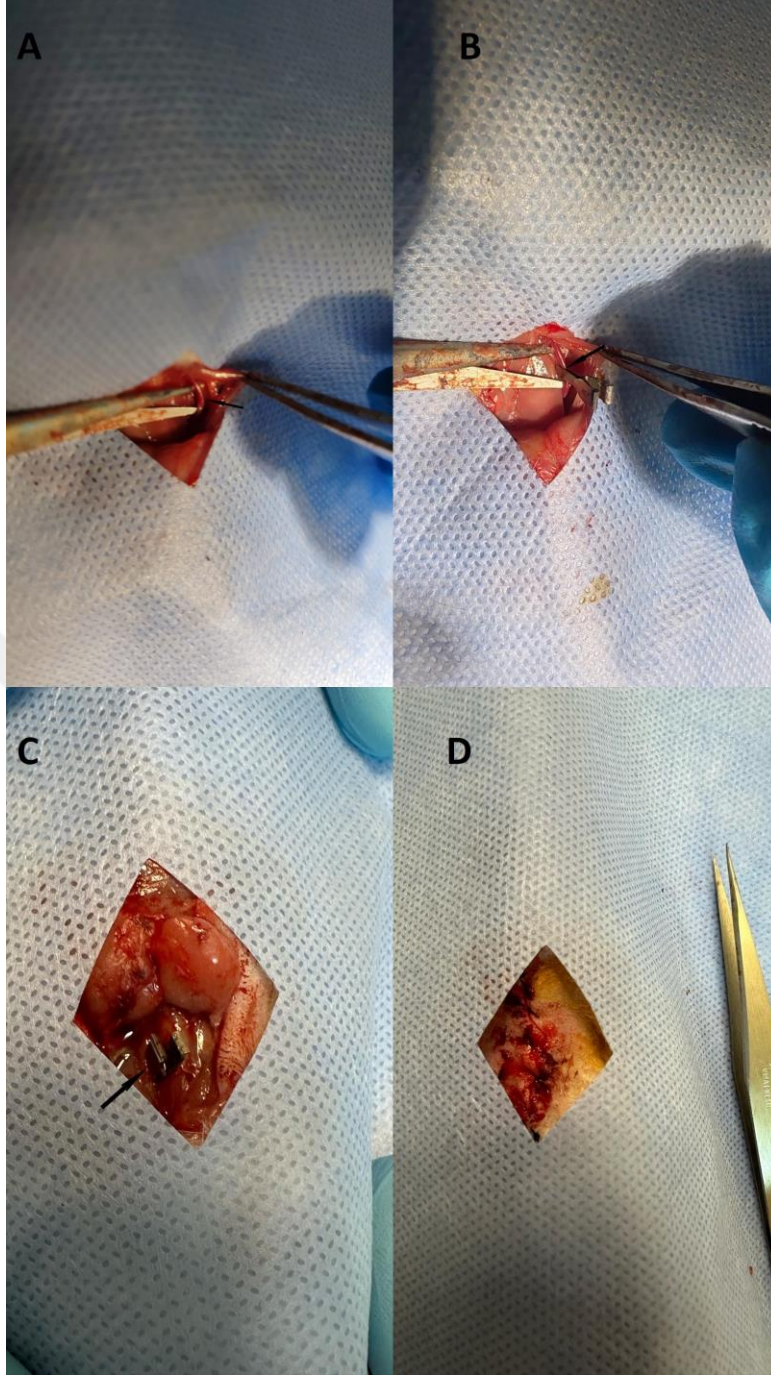
Çizelge 2.3. Hayvan Deneyi Tasarımı





Şekil 2.1. Deneysel cerrahi prosedürü

A: Deri insizyonu, B: sıçan tükrük bezleri, C: Trakea, D: Sağ Ortak karotis arter



Şekil 2.2. Sağ Ortak karotis arter iskemi/reperfüzyonu

A: Sağ Ortak karotis arter, B: CCA'nın klempelenmesi, C: İskemi modelinin oluşturulması,
D: CCA'nın reperfüzyonu ve derinin dikilmesi

2.5. Biyokimyasal Yöntemler

2.5.1. Doku Homojenizasyonu

Sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen beyin doku örnekleri numaralandırılarak örnek kutularının içinde derin dondurucuda -80°C ' de muhafaza edildi. Uygun

ağırlıkta (140 mg) beyin dokuları soğuk fosfat tamponlu salinde (PBS, pH 7,4) homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 2000-3000 r.p.m. hızında 20 dakika santrifüj yapıldı ve supernatant elde edildi.

2.5.2. Bradford Yöntemi ile Doku Protein Miktarı Tayini

Beyin doku örneklerinin Bradford yöntemi ile protein ölçümleri yapıldı. Bradford metodunda, 150 µl reaktif ve 10 µl örnek ve standart kullanıldı. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 660 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

Hesap ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$): $\text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{standart}} \times \text{DerişimStandart}$ (Bradford, 1976).

2.5.3. TOS Düzeyinin Belirlenmesi

TOS seviyeleri tayini için ticari olarak temin edilebilen kitler (Cat No: RL0024, Relassay, Türkiye) kullanıldı. Yeni yöntemde, numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitledi. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirildi. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluşturdu. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarıyla ilişkilendirildi. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi. Litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equvalan/L) cinsinden ifade edildi. Dalga boyu ana dalga boyu 560 nm, ikincil dalga boyu 800 nm (İki renkli) olarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. R1 ve R2'nin karıştırılarak (numune körü olarak) değerlendirildi (Erol 2005).

2.5.4. TAS Düzeyinin Belirlenmesi

TAS düzeyleri ticari olarak temin edilebilen kitler (Cat No: RL0017, Relassay, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem ile stabil bir ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) radikal katyonunun karakteristik renginin antioksidanlar tarafından ağartılmasına dayanmaktadır. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edildi. Dalga boyu 660 nm (veya diğer tepe dalga boyu 420 ve 740 nm) olarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (Erol, 2004).

2.5.5. OSİ (Oksidatif Stres İndeksi)

TOS'un TAS'a oranı OSİ olarak kabul edildi. Hesaplama için elde edilen TAS birimi $\mu\text{mol}/\text{L}$ 'ye dönüştürüldü ve OSİ değeri aşağıdaki Formüle göre hesaplandı:

OSI (isteğe bağlı birim) = TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L) / TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ eşdeğeri/L) x100 (Yumru ve ark. 2009, Kosecik ve ark. 2005, Harma ve ark. 2003).

2.5.6. MDA Düzeyinin Belirlenmesi

Doku MDA düzeyinin belirlenmesi: Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan MDA'nın belirlenmesi, Tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik oluşturmasına dayanmaktadır. Sonuçlar, plazma için nmol/ml, doku için ise nmol/g olarak rapor edildi. (Ohkawa ve ark., 1979).

Kullanılan çözeltiler: Radyoimmünopresipitasyon (RIPA) tamponu (Cayman 100010263 ABD): Bu tampon çözelti ticari bir test kitinden hazır olarak temin edilmiştir. Testin çalışma prensibi: Yüksek sıcaklıkta (100 oC) ve asidik bir ortamda bekletilerek MDA-tiobarbitürik asit yapılarının oluşması sağlanıp kolorimetrik ölçüm gerçekleştirildi.

MDA (μM): [(ölçülen absorbans) – (y-intercept)/slope]

Çalışmada beyin doku MDA düzeyleri kalibrasyon grafiğinden μM cinsinden hesaplandı. Ardından, doku proteinine bağlı olarak nmol/g protein şeklinde değerlendirildi. Hesaplamalar yapılırken MDA'nın molekül ağırlığı olan 72.0636 dikkate alındı (Ohkawa ve Ark. 1979).

2.5.7. Total Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

Toplam GSH (Cat No: Otto3053, Otto Scientific, Türkiye), Alisik ve ark. tarafından 2019 yılında açıklanan yöntemle belirlendi. Süpernatant örneklerinin GSH düzeyleri için, 500 mM Tris çözeltisi (pH: 8,2) kullanıldı.

- 1) 10 cm'lik ikincil tüplere altı yüz mikrolitre süpernatant eklendi.
- 2) Daha sonra 150 μL RR eklendi. 15 dakikalık inkübasyonun ardından 70 μL SR ilave edildi.
- 3) Ardından otomatik ölçüm prosedürüne göre spektrofotometrik olarak 415 nm'de ölçüldü (Alisik ve ark. 2019).

2.5.8. Glial Fibriler Asidik Protein Analizi

GFAP seviyeleri tayini için ticari olarak temin edilebilen elisa kiti (DZE201110971, Sunredbio, Çin) kullanıldı. Ölçümler aşağıdaki kit protokolüne göre yapıldı.

1. Blank kuyucuğuna sadece kromojen solüsyonu A ve B uygulandı ve daha sonra stop solüsyonu uygulandı.
2. Standart kuyucuklara 50 mikrolitre eklendi Streptavidin HRP 50 mikrolitre de eklendi.
3. Test kuyucuklara 40 mikrolitre numune/örnek ekledi ve daha sonra hem GFAP antibody 10 mikrolitre ve Streptavidin HRP 50 mikrolitre eklendi ve daha sonra membranı ile kapatıldı.
4. Sonra da 60 dk 37 C de inkübe edildi.
5. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi.
6. Kuyulara kromojen solüsyonu A 50 mikrolitre eklendi ve daha sonra kromojen solüsyonu B 50 mikrolitre eklendi ve 10 dk 37 °C de inkübe edildi.
7. Stop solüsyonu her kuyuya 50 mikrolitre ekleyip reaksiyonu durduruldu. Stop solüsyonu ekledikten sonra 15 dk içinde optik dansite 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.5.9. Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Analizi

NSE seviyeleri tayini için ticari olarak temin edilebilen ELİSA kiti (DZE201110542, Sunredbio, Çin) kullanıldı. Ölçümler aşağıdaki kit protokolüne göre yapıldı.

1. Blank kuyucuğuna sadece kromojen solüsyonu A ve B uygulandı ve daha sonra stop solüsyonu uygulandı.
2. Standart kuyucuklara 50 mikrolitre eklendi Streptavidin HRP 50 mikrolitre de eklendi.
3. Test kuyucuklara 40 mikrolitre numune/örnek eklendi ve daha sonra hem GFAP antibody 10 mikrolitre ve Streptavidin HRP 50 mikrolitre ekledik ve daha sonra membranı kapatıldı 60 dk 37 °C de inkübe edildi.
4. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi.
5. Kuyulara kromojen solüsyonu A 50 mikrolitre eklendi ve daha sonra kromojen solüsyonu B 50 mikrolitre eklendi ve 10 dk 37 °C de inkübe edildi.
7. Stop solüsyonu her kuyuya 50 mikrolitre ekleyip reaksiyonu durduruldu. Stop solüsyonu ekledikten sonra 15 dk içinde optik dansite 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.6. Histopatolojik Yöntem

Deneysel aşama tamamlandıktan sonra tüm sıçanlar ötenazi edildi ve beyin örnekleri dikkatlice toplandı. Beyin örneklerine tespit solüsyonunun daha iyi nüfuz etmesi için küçük kesiler atıldı ve %10 tamponlu formaldehit solüsyonuna konularak tespit işlemine başlandı. Tüm örnekler formaldehit solüsyonunda iki gün bekletildi ve sertleşmesi sağlandıktan sonra uzunlamasına kesilerek doku takip kasetlerine yerleştirildi. Kasetlerin üzerine hayvan ve grup numaraları yazıldı ve tekrar formaldehit solüsyonuna konularak daha iyi tespit için bir gün daha bekletildi. Beyin örneklerinin bulunduğu kasetler, doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirilerek rutin doku takibi işlemi gerçekleştirildi. Örnekler, gece boyunca artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirilerek %100 alkole kadar getirildi ve dokulardaki suların çekilmesi sağlandı. Ardından, örnekler iki seri ksilol solüsyonundan geçirilerek yağın eritilmesi ve sıcak parafinden geçirilerek doku aralıklarına parafinin yerleşmesi sağlandı. Gece boyunca otomatik doku takip cihazında işlem gören örnekler, ertesi gün parafine gömüldü ve parafin blokları elde edildi. Doku takibi tamamlanan örnekler, blokaj işlemi için doku gömme cihazına (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) konuldu ve parafin blokları oluşturuldu. Blokların kolay ayrılması için soğuk tabla bölümüne alındı ve bir saat boyunca bekletilerek parafinin donması sağlandı. Hazırlanan bloklardan kesitler alındı ve hem histopatolojik hem de immünohistokimyasal incelemeler için 5 µm kalınlığında seri kesitler elde edildi. Kesitler rutin şekilde hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Kesitlerin kurutulması ve lama tam olarak yapıştırılması için 60 °C'ye kadar ısıtılmış etüvde 2 saat bekletildi. Parafini eritmek için kesitler 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi ve ardından düşük dereceli alkollere (sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkoller) geçirilerek dokuların rehidrasyonu sağlandı. Harris hematoksilin ve eozin ile rutin boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler, dehidrasyon sürecine alınarak yüksek dereceli alkollere geçirildi ve suyun tamamen emilimi sağlandı. Son olarak, kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve bir gün kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskop altında incelendi.

Bu amaçla doku takibi tamamlanan örnekler ototeknikon cihazından alınarak blokaj işlemi için doku gömme cihazına (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem,

Nussloch, Almanya) konuldu ve özel çelikten yapılmış doku blokaj metalleri içerisinde parafin bloklar oluşturuldu. Bu metal kalıplardan parafin blokların kolay ayrılması için parafin bloklar doku gömme ünitesinin soğuk tabla bölümüne alındı ve bu tabla üzerinde bir saat tutularak parafinin donması ve blokların oluşması gerçekleştirildi. Hazırlanan bu blokların herbirinden 4-5 saat soğutmadan sonra hem histopatolojik hemde immunohistokimyasal incelemeler için tam otomatik Leica 2155 rotary mikrotom (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Normal lama alınan beyin kesitleri rutin şekilde hematoksilin-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Bu amaçla lam üzerine alınan beyin örnekleri 60°C'ye kadar ısıtılmış etüv içinde 2 saat tutularak kurutuldu ve kesitlerin lama tamamen yapışması sağlandı. Bu işlemin ardından kesitlerin üzerindeki parafini eritmek için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Hemen ardından doku kesitleri yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere (sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkoller) geçirilerek dokuların rehidre edilmesi sağlandı. Takiben Harris hematoksilin ile 15 dakika ve ardından eozinde 3 dakika boyanarak rutin hematoksilin-eozin (HE) boyaması gerçekleştirildi. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler dehidrasyon sürecine alınarak düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkoller) geçirildi ve kesitlerdeki suyunun tamamen emilimi gerçekleştirildi. Son olarak ksilol ile parlatılan kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve bir gün kurumaya bırakıldı ardından mikroskop altında incelendi.

Sonuçların fotoğraflanması için Olympus CX41 model mikroskop ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

Histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Beynin değişik bölgeleri hiperemi, ödem, kanama, gliosis, nöronal hasar ve gliosis dahil olmak üzere çeşitli histopatolojik lezyonlar açısından yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Lezyonlar şiddetine göre 0'dan 3'e kadar skorlandı. Bu amaçla 1; alanların %20'sinden azındaki lezyonları, 2; alanların %20-60'ındaki lezyonları ve 3; tüm alandaki lezyonları ifade etmek için kullanıldı.

Ayrıca beyin korteksinde dejeneratif piramidal nöronların yüzdesi Image version 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda MD) programı ile 20X büyütme ile 100

piramidal hücrenin bir ışık mikroskobu altında sayılmasıyla hesaplandı. Nöronlarda büzüşme, sitoplazmada Nissl maddesinin kaybı ve eosinofili ile birlikte koyu renkli, kontrakte çekirdek bulunanlar hücreler dejeneratif nöronlar olarak kabul edildi. Belirlenen dejeneratif nöronlar, tüm nöronlara oran olarak ifade edildi.

2.7. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal çalışmalarda; veriler, ortalama \pm standart hata (SE) şeklinde verildi. Biyokimyasal bulguların istatistiksel analizleri, SPSS 18.0 paket programı (PASW Statistics, Chicago, USA) kullanılarak yapıldı. Grupların parametrik veya non-parametrik dağılım gösterip göstermediğine, normalite testiyle (Shapiro–Wilk test) bakıldı. Parametrik dağılım gösteren TOS; OneWay ANOVA testi yapıldı ve gruplar arası farkın önemliliğini belirlemek için Duncan testi uygulandı ($p<0.05$). Non-parametrik dağılım gösteren MDA, TAS, OSI, GSH, NSE ve GFAP; Kruskal-Wallis testi yapıldı ve gruplar arası farkın önemliliğini belirlemek için Bonferroni düzeltilmeli ($p<0,00178$) Mann-Whitney *U* testi uygulandı. Histopatolojik veriler, ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde verildi. Histopatolojik skor ve dejeneratif nöron yüzdesinin istatistik analizi için SPSS-22.00 paket program kullanıldı. Gruplar arası farklar Duncan testi ile belirlendi. $P<0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabuledildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

3.1.1. Beyin Dokusu Oksidan-Antioksidan Düzeyleri

Çalışma gruplarının beyin dokusu oksidan-antioksidan düzeyleri Çizelge 3.1’de verildi. Beyin dokusunda TAS ve GSH değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi. Ancak, CCA grubunda diğer gruplara nazaran TAS ve GSH değerlerinde bir düşüş görülmesine rağmen anlamlı değildi ($p>0,05$). TOS değeri bakımından kontrol grubuna kıyasla CCA grubu göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Tek başına SA veya ST uygulama iskemi/reperfüzyon hasarında artan TOS değerini istatistiksel açıdan anlamlı seviyede azalma görülmedi ($p>0,05$).

Oksidatif stresin değerlendirilmesi için kullanılan OSI, TOS’un TAS’a oranıdır. CCA grubunda OSI değeri diğer çalışma gruplarına kıyasla yüksek bulundu ($p<0,001$). CCA grubunda kıyasla CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında OSI değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$). Buna ilaveten OSI değeri; kontrol, SA, ST ve SA+ST grupları arasında istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmedi ($p>0,05$).

MDA değeri oksidatif stresi gösteren bir diğer parametredir. MDA değeri; kontrol grubuna kıyasla CCA grubunda anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$). MDA değeri; CCA grubuna kıyasla CA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında azalma olmasına rağmen istatistiksel bir fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). GSH değeri; diğer çalışma gruplarına kıyasla CCA grubunda düşük olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.1. Çalışma gruplarının beyin dokusu oksidan-antioksidan düzeyleri

Gruplar	TAS (mmol/L)	TOS (μmol/L)	OSI	MDA (nmol/ g protein)	GSH (mmol/L)
Kontrol	1.18 \pm 0.26	6.93 \pm 1,66 ^{bc}	0,58 \pm 0.04 ^c	4,88 \pm 0.21 ^{bc}	35,70 \pm 10.64
CCA	0.83 \pm 0.13	12.50 \pm 1.21 ^a	1,62 \pm 0.21 ^a	11,83 \pm 0.38 ^a	9,17 \pm 1.47
CCA+SA	1.30 \pm 0.06	11.79 \pm 1,39 ^{ab}	0,90 \pm 0.08 ^{bc}	11,08 \pm 0.39 ^a	14,21 \pm 2.29
CCA+ST	1.29 \pm 0.27	12.83 \pm 2,29 ^a	1,08 \pm 0.16 ^b	10,68 \pm 0.09 ^a	13,64 \pm 1.14
CCA+SA+ST	1.49 \pm 0.30	11.76 \pm 2,12 ^{ab}	0,84 \pm 0.06 ^b	11,13 \pm 0.48 ^a	23,80 \pm 4.79
SA	1.42 \pm 0.18	10.42 \pm 1,24 ^{abc}	0,77 \pm 0.10 ^{bc}	9,31 \pm 0.67 ^{ab}	23,85 \pm 4.02
ST	1.82 \pm 0.19	11.69 \pm 1,15 ^{ab}	0,65 \pm 0.02 ^c	7,31 \pm 0.30 ^c	42,64 \pm 8.58
SA+ST	1.11 \pm 0.06	5.98 \pm 0,44 ^c	0,54 \pm 0.03 ^c	7,22 \pm 0.43 ^c	26,00 \pm 5.77
P değeri	p>0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001	p>0.05

(^{a,b,c}) Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel fark vardır (ortalama \pm SE) (p < 0,05, p < 0,001).

3.1.2. Beyin Dokusu NSE ve GFAP Düzeyleri

NSE ve GFAP; travmatik beyin hasarı durumunda kullanılabilir biyobelirteçlerdir. Çalışma gruplarının beyin dokusu NSE ve GFAP düzeyleri Çizelge 3.2’de verildi. Diğer çalışma gruplarına kıyasla NSE ve GFAP düzeyleri CCA grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.001). CCA grubunda kıyasla CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında NSE düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı (p<0,001). GFAP düzeyi, CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında, CCA grubuna göre istatistiksel açıdan azaldığı gözlemlendi (p<0,001).

Çizelge 3.2. Çalışma gruplarının beyin dokusu NSE ve GFAP düzeyleri

Gruplar	NSE (ng/ml)	GFAP (ng/ml)
Kontrol	16,52 \pm 0.11 ^f	5,39 \pm 0.07 ^d
CCA	25,30 \pm 0.35 ^a	11,66 \pm 0.16 ^a
CCA+SA	23,17 \pm 0.20 ^b	10,53 \pm 0.08 ^b
CCA+ST	23,88 \pm 0.11 ^{bc}	10,56 \pm 0.04 ^b
CCA+SA+ST	23,95 \pm 0.07 ^c	10,62 \pm 0.05 ^b
SA	22,62 \pm 0.48 ^{bcd}	9,68 \pm 0.36 ^{b^c}
ST	20,66 \pm 0.21 ^e	8,70 \pm 0.08 ^c
SA+ST	19,61 \pm 0.88 ^{def}	7,68 \pm 0.63 ^{cd}
P değeri	p<0.001	p<0.001

(^{a,b,c,d,e,f}) Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel fark vardır (ortalama \pm SE) (p < 0,001).

3.2. Histopatolojik Bulgular

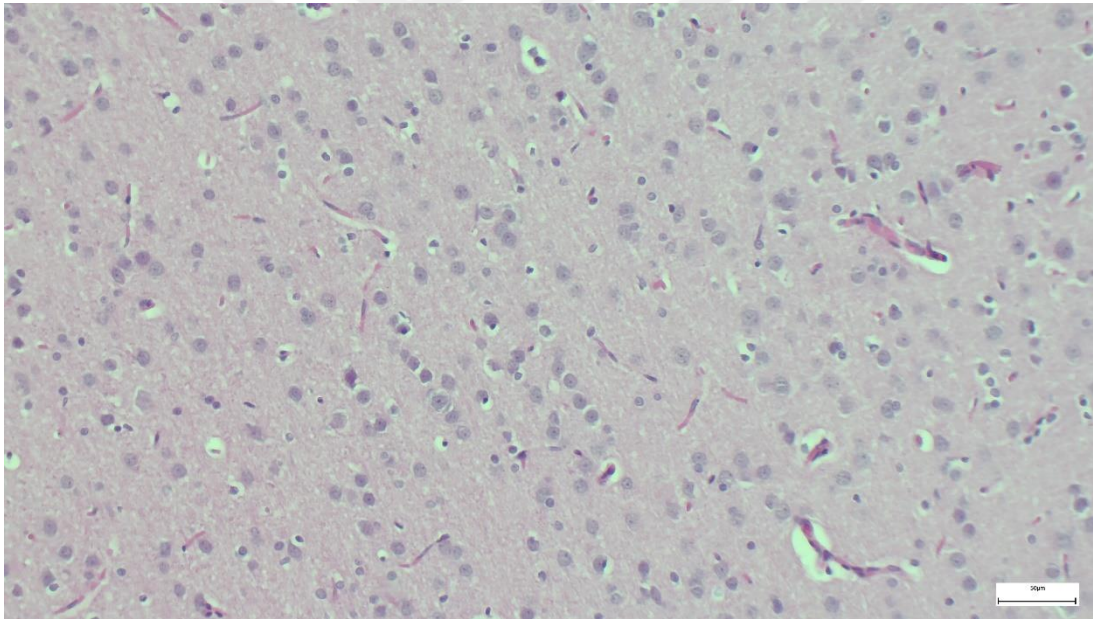
Tüm gruplarda patolojik bulguları değerlendirmek için prefrontal korteks, hipokampus ve beyincik dokuları incelendi. Çalışma gruplarına göre beyin korteksi, beyincik ve hipokampusların histopatolojik skorları ile beyin korteksinde dejeneratif piramidal nöron yüzdelerinin istatistik analizleri Çizelge 3.3’de verildi. Kontrol grubunda normal doku histolojisi gözlemlendi (Şekil 3.1-3). CCA grubundaki ratların beyin, hipokampus ve beyinciklerinde hiperemi, nöronal dejenerasyon, nöronofaji ve belirgin ödem dikkati çekti (Şekil 3.4-6). CCA+ST grubunda patolojik bulguların azaldığı saptandı. Bu grupta sadece 3 ratta hiperemi gözlenirken hiçbir hayvanda dejeneratif değişiklik ve nöronofajiye rastlanmadı (Şekil 3.7-9). CCA+SA grubunda patolojik bulgularda belirgin azalmalar gözlemlendi. Bu gruptaki ratların üçünde hiperemi birinde belirgin ödem saptanırken hiçbir hayvanda nöronal dejenerasyonlar gözlenmedi (Şekil 3.10-12). CCA+SA+ST grubunda hiçbir hayvanda nöronal dejenerasyon gözlenmedi. Sadece 1 ratta beyin korteksinde hafif hiperemi ve ödem gözlemlendi (Şekil 3.13-15). ST grubundaki ratların hiçbirinde beyin, hipokampus ve beyincik dokularında patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 3.16-18). SA grubundaki ratların hiçbirinde beyin, hipokampus ve beyincik dokularında patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 3.19-21). SA+ST grubundaki ratların hiçbirinde beyin, hipokampus ve beyincik dokularında patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 3.22-24).

Beynin değişik bölgeleri hiperemi, ödem, kanama, gliosis, nöronal hasar ve gliosis dahil olmak üzere çeşitli histopatolojik lezyonlar açısından yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Kontrol, SA, ST ve SA+ST grupları arasında histopatolojik olarak istatistiksel bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). CCA grubunun histopatolojik değişiklikler değeri diğer çalışma gruplarına kıyasla yüksek bulundu ($p<0,001$). Bu CCA grubunun histopatolojik değişikliklerdeki artış, tedavi grupları olan CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p<0,001$). Beyin korteksinde dejeneratif piramidal nöronların yüzdesi Diğer gruplara kıyasla CCA grubunda istatistiksel olarak arttığı bulundu ($p<0,001$). Bu CCA grubundaki dejeneratif nöron yüzdesindeki artış, tedavi grupları olan CCA+SA, CCA+ST ve CCA+SA+ST gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$).

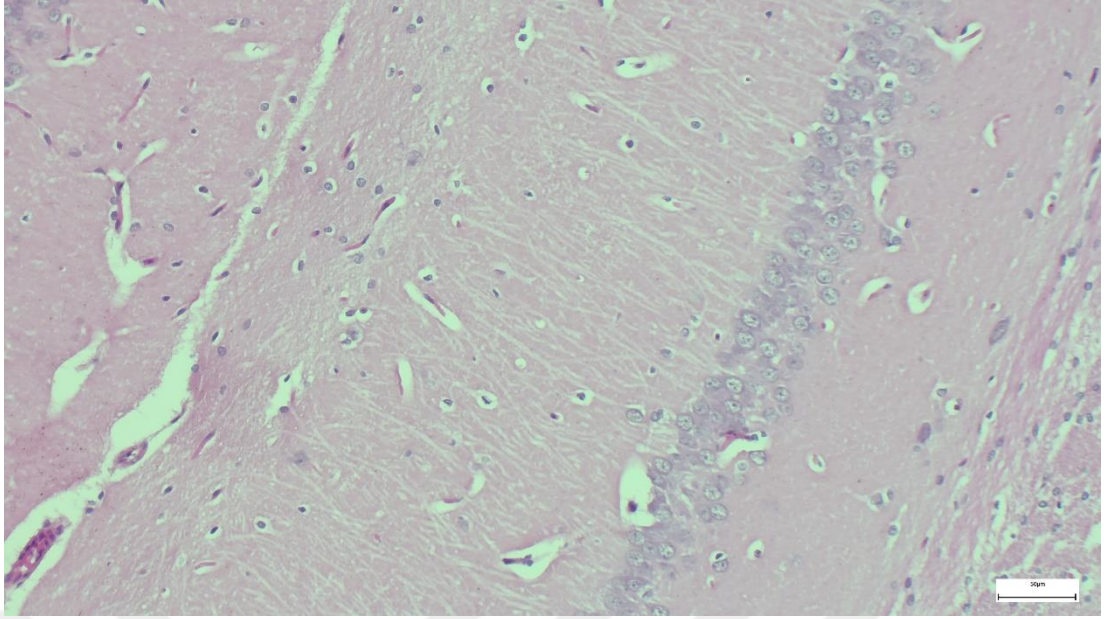
Çizelge 3.3. Grupların histopatolojik skor ve dejeneratif nöron yüzdesi sonuçları

Gruplar	Beyin	Beyincik	Hipokampus	Dejeneratif nöron yüzdesi
Kontrol	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	4.57±0.78 ^{ab}
CCA	2.60±0.16 ^b	2.70±0.15 ^b	2.30±0.15 ^b	48.20±1.20 ^c
CCA+SA	1.00±0.37 ^c	1.00±0.37 ^c	0.42±0.20 ^{ac}	17.57±0.68 ^e
CCA+ST	0.85±0.40 ^{cd}	0.85±0.40 ^c	0.85±0.40 ^c	20.85±1.31 ^d
CCA+SA+ST	0.28±0.28 ^{da}	0.14±0.14 ^a	0.14±0.14 ^a	8.71±0.71 ^f
SA	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	4.57±0.52 ^{ab}
ST	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	5.14±1.67 ^b
ST+SA	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.14±0.26 ^a
P değeri	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

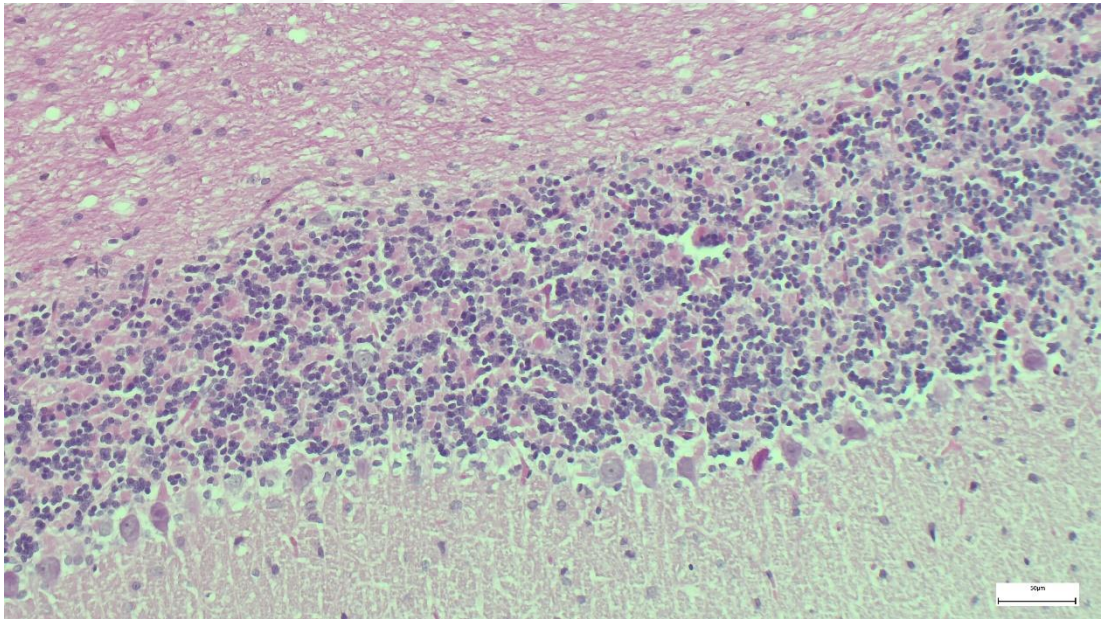
(^{a,b,c,d,e,f}) Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel fark vardır (ortalama ± SD) (p < 0,001).



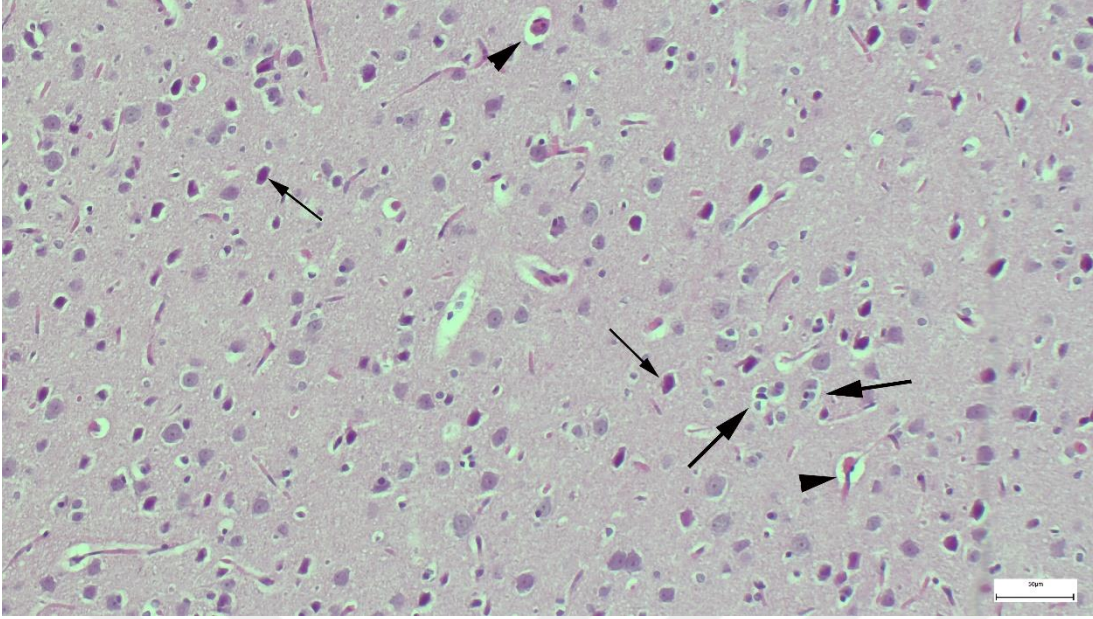
Şekil 3.1. Kontrol grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



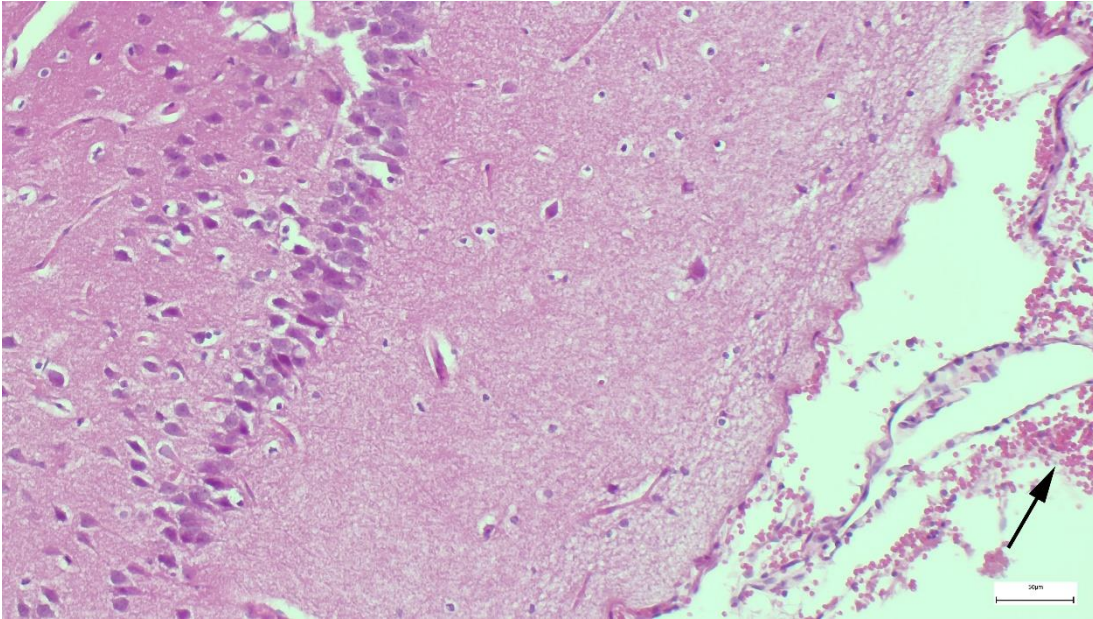
Şekil 3.2. Kontrol grubunda hipokampus görünümü, HE, Bar=50µm.



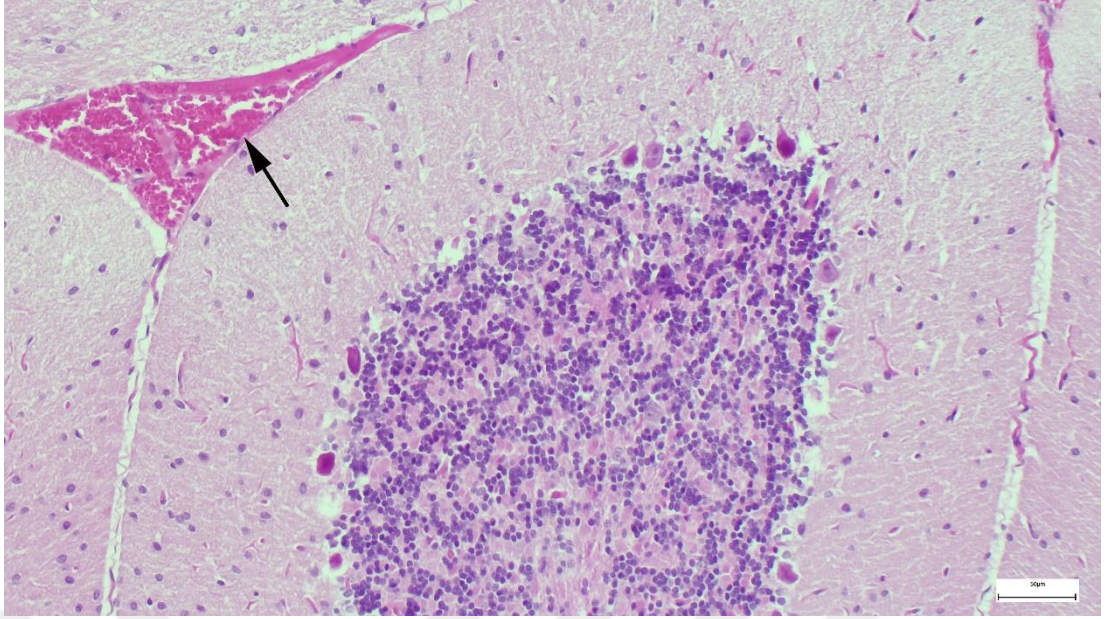
Şekil 3.3. Kontrol grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



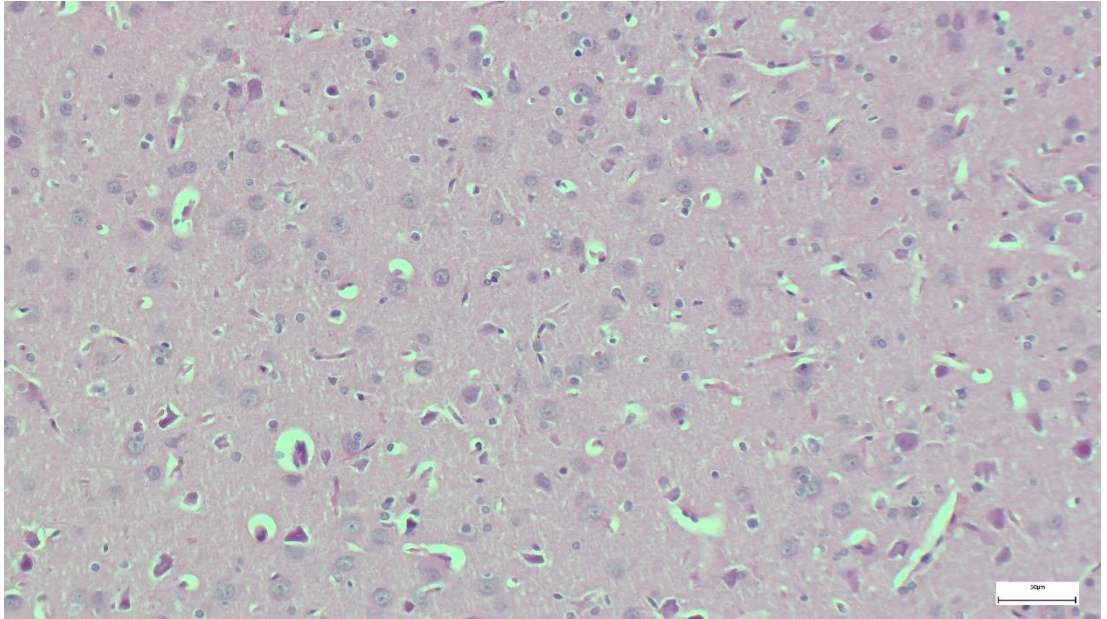
Şekil 3.4. CCA grubunda beyin korteksi görüntüsü hiperemi (ok başları), nöronofaji (kalın oklar) ve dejeneratif piramidal nöronlar (ince oklar), HE, Bar=50µm.



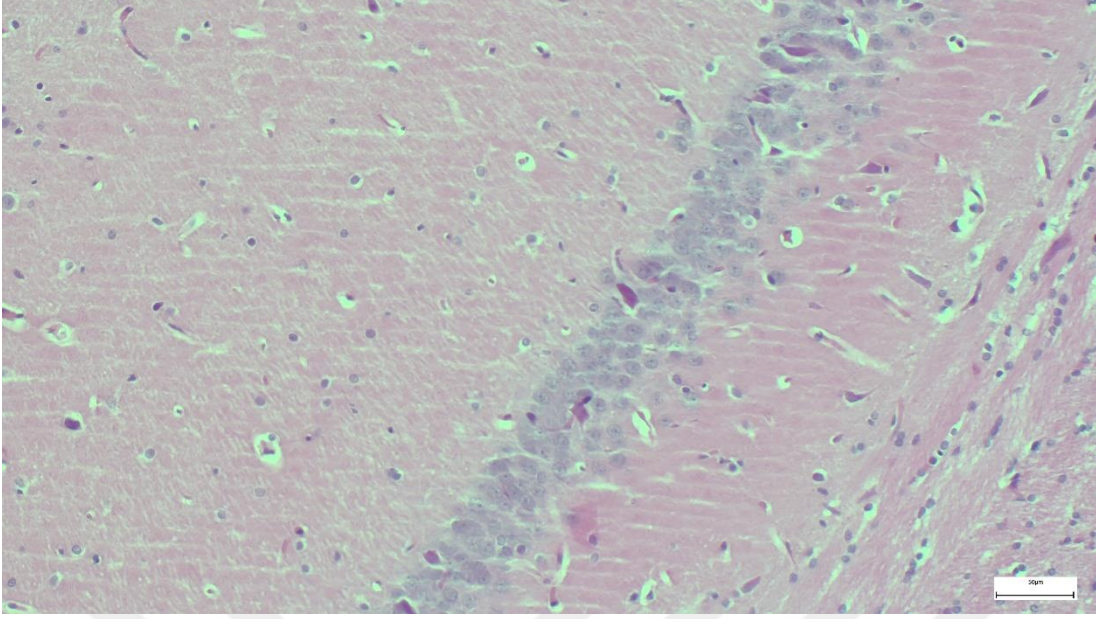
Şekil 3.5. CCA grubu hipokampus görüntüsü kanama alanı (ok), HE, Bar=50µm.



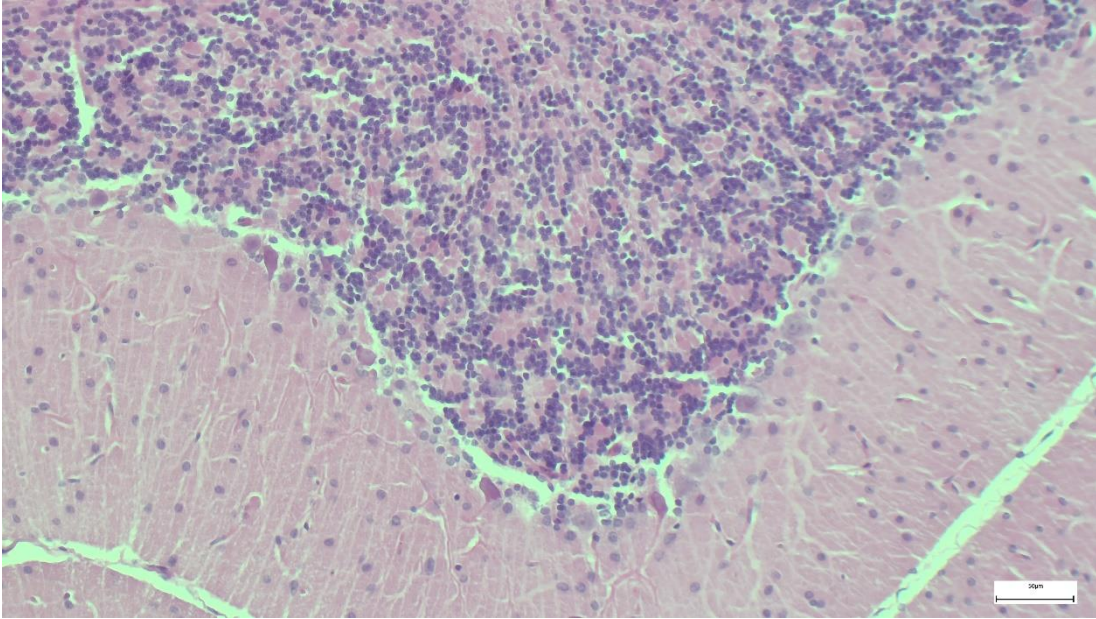
Şekil 3.6. CCA grubu beyincik görüntüsü meningeal alanda kanama (ok), HE, Bar=50µm.



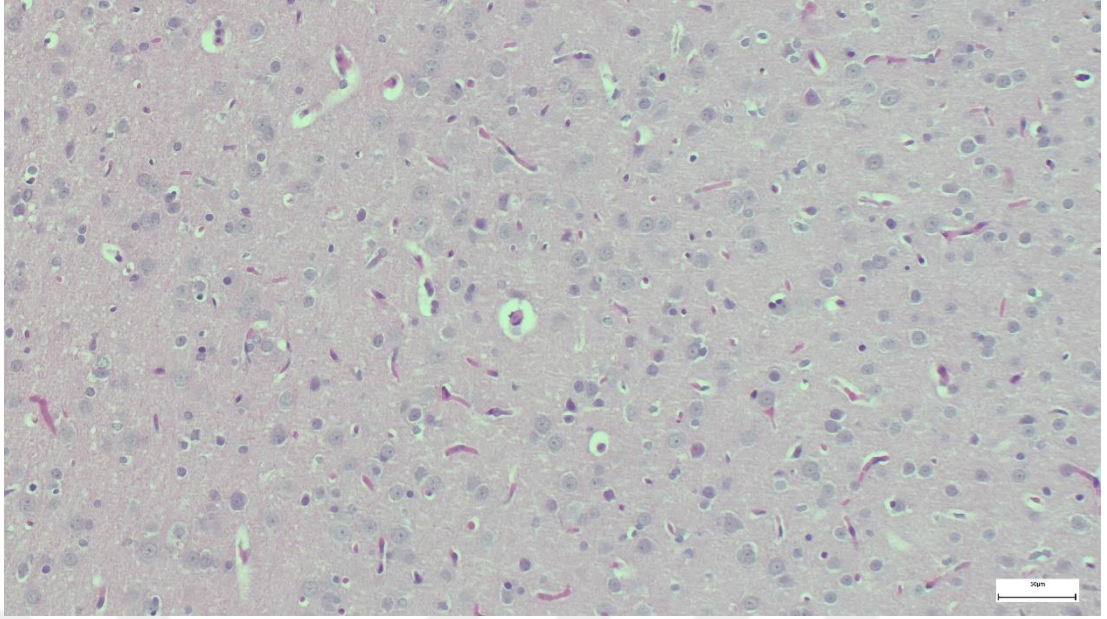
Şekil 3.7. CCA+ST grubu beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



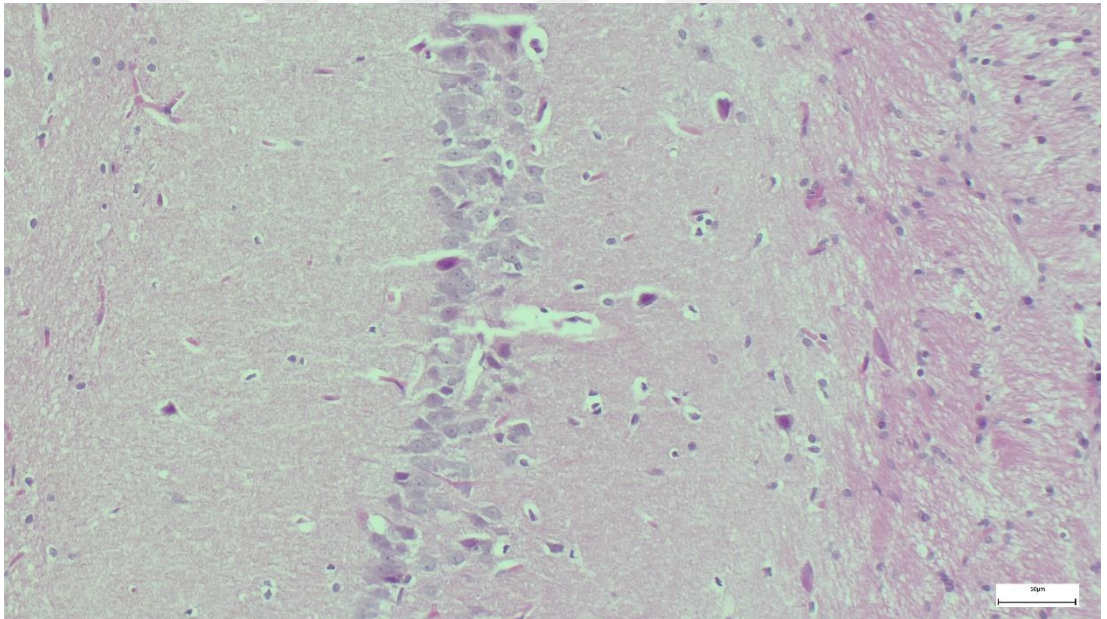
Şekil 3.8. CCA+ST grubunda hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



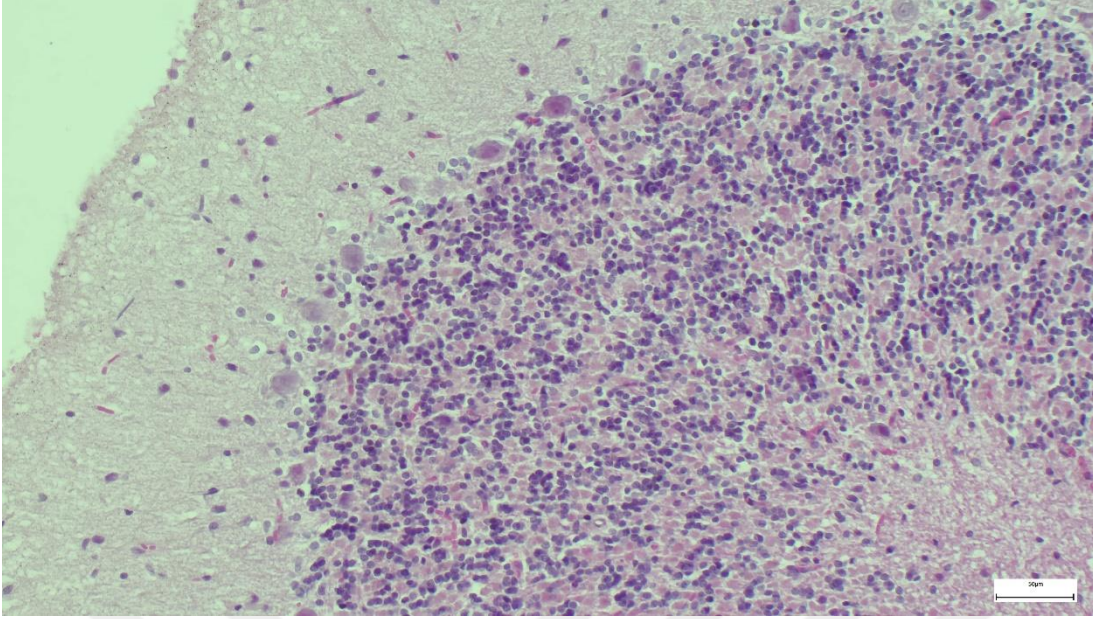
Şekil 3.9. CCA+ST grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



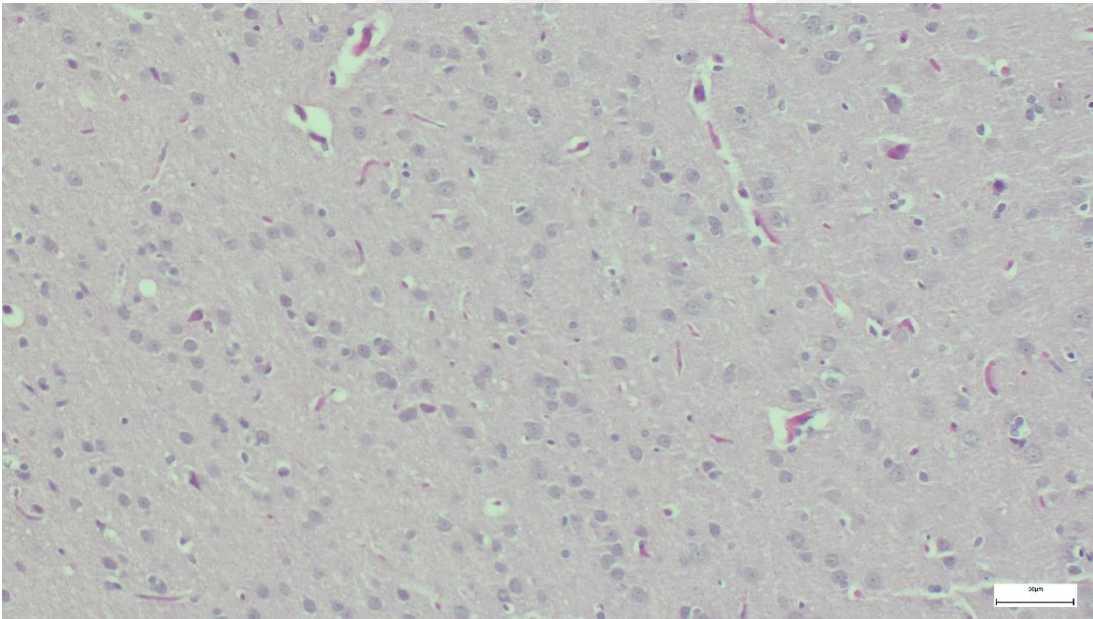
Şekil 3.10. CCA+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



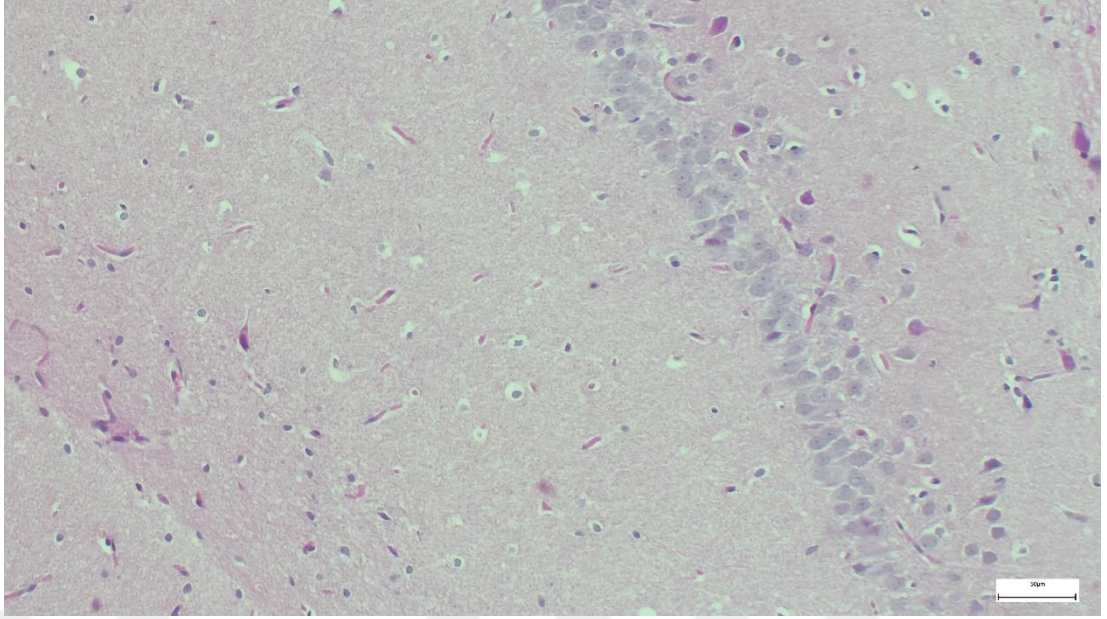
Şekil 3.11. CCA+SA grubunda hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



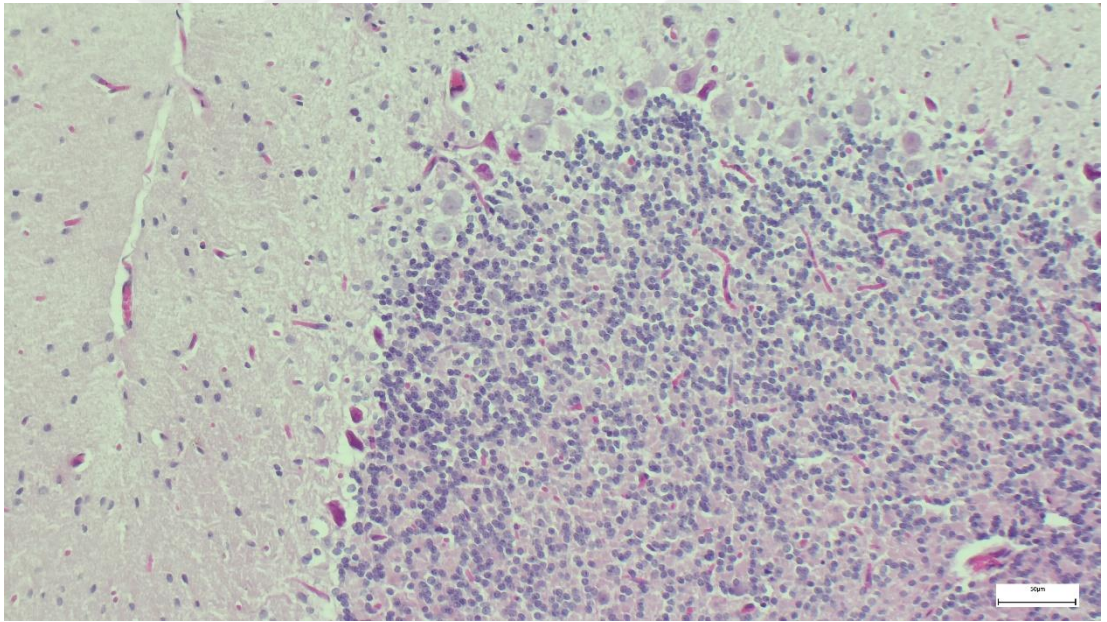
Şekil 3.12. CCA+SA grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



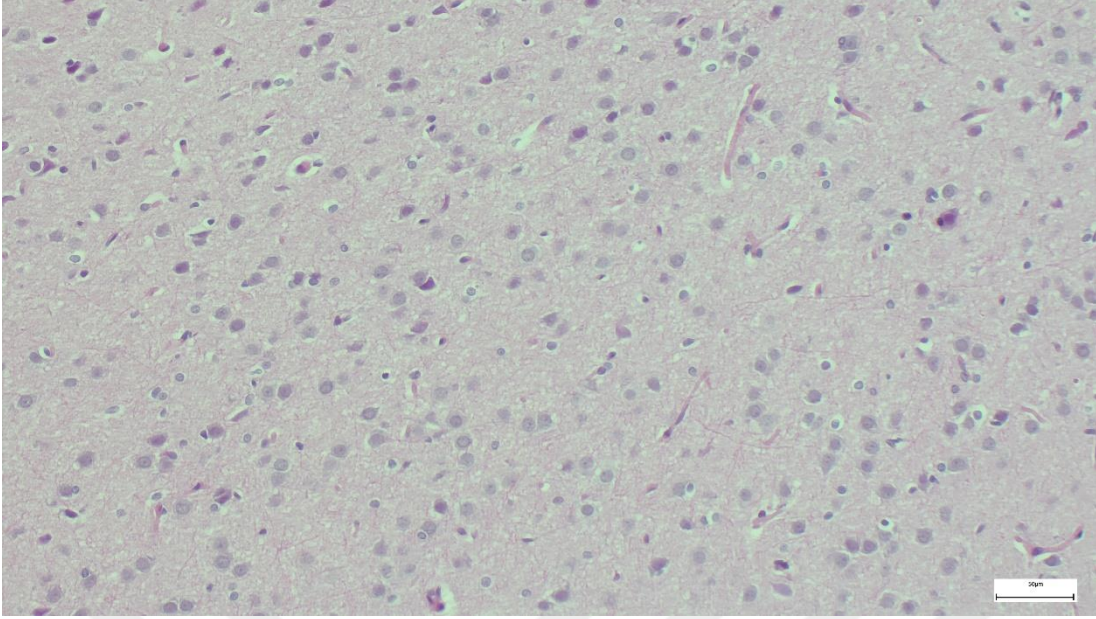
Şekil 3.13. CCA+ST+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



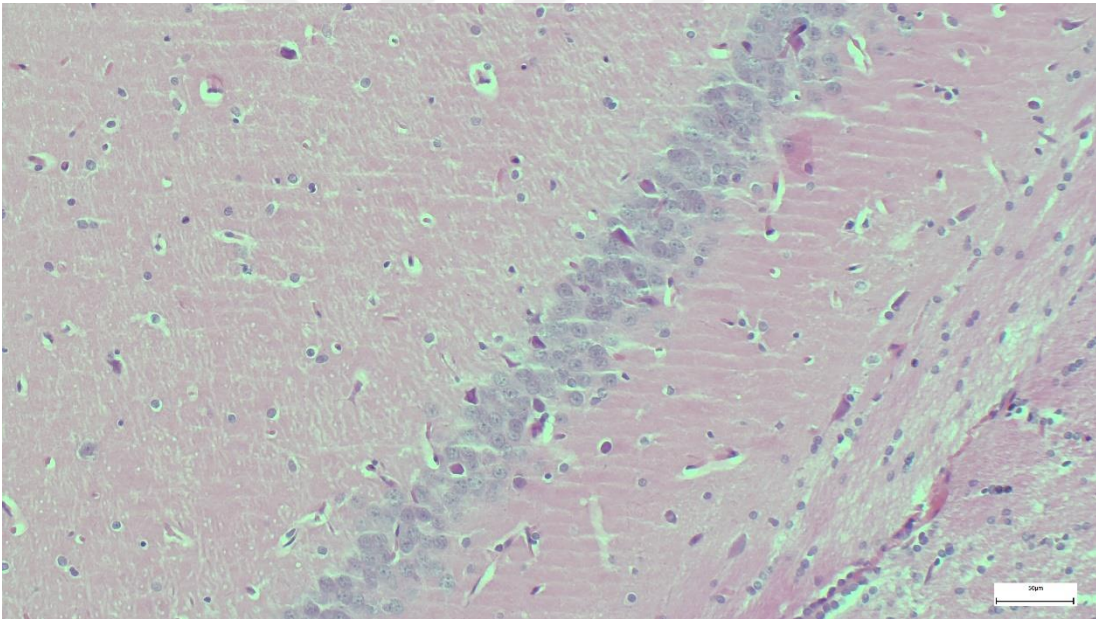
Şekil 3.14. CCA+ST+SA grubunda hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



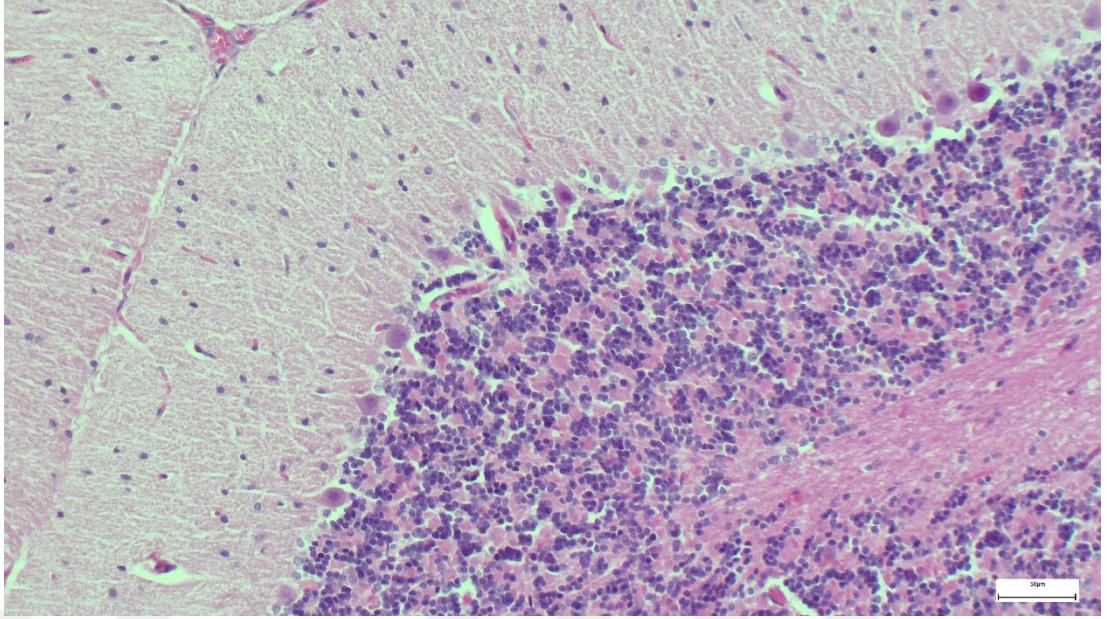
Şekil 3.15. CCA+ST+SA grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



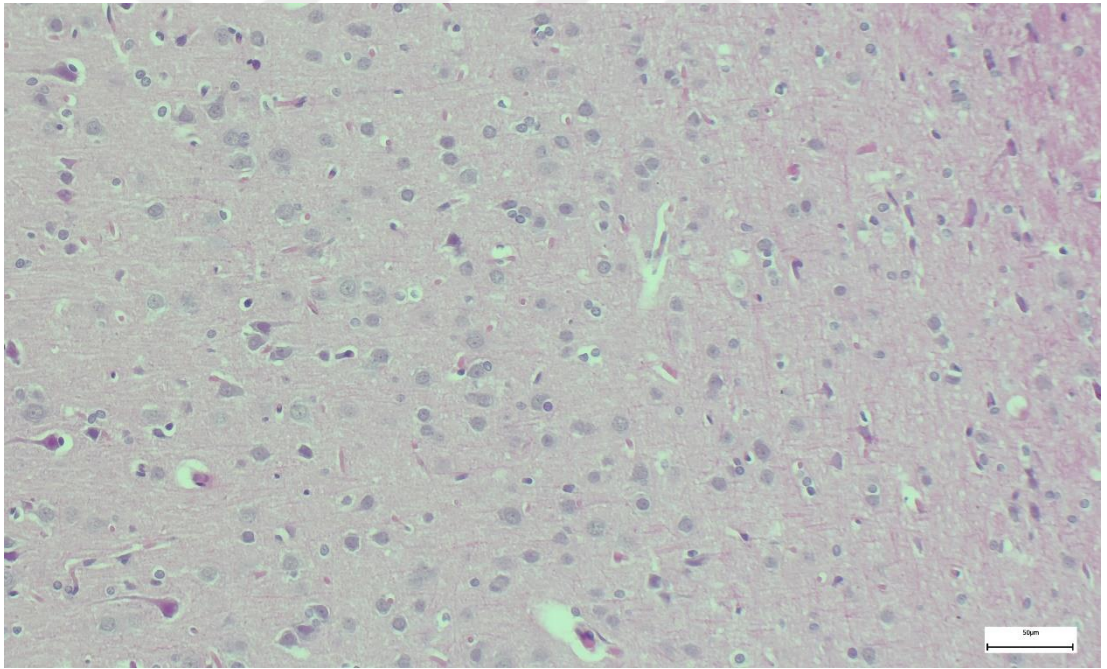
Şekil 3.16. ST grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



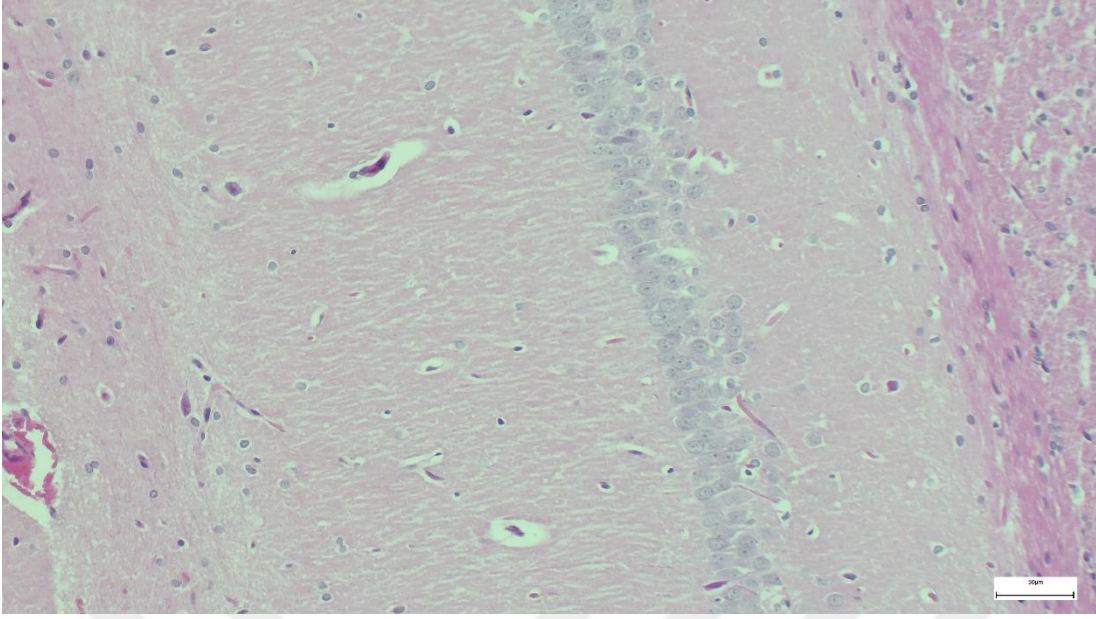
Şekil 3.17. ST grubunda hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



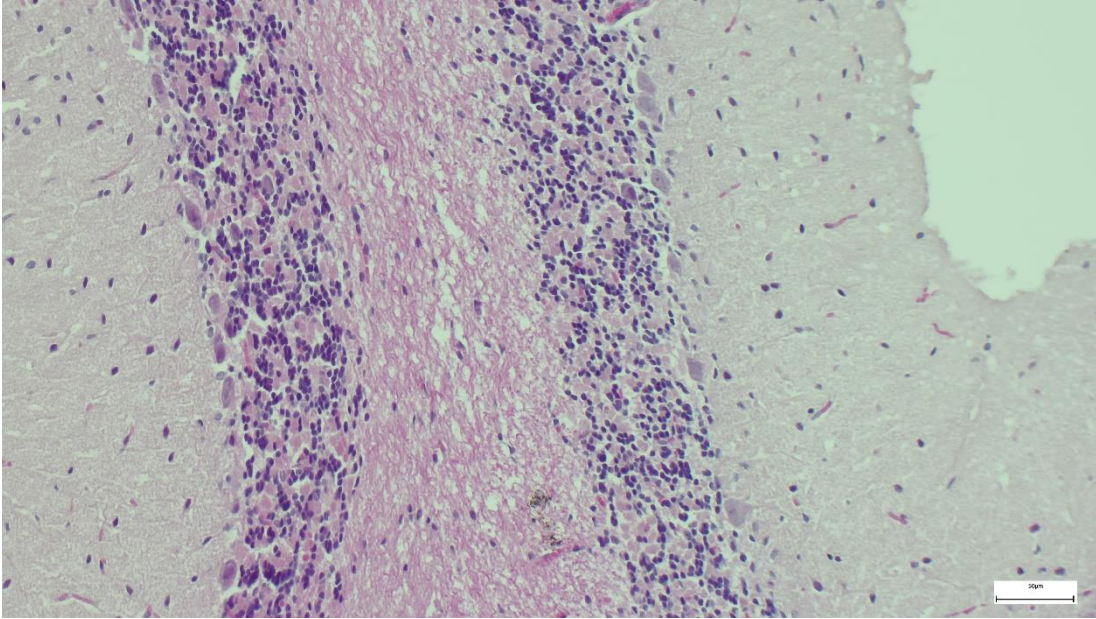
Şekil 3.18. ST grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



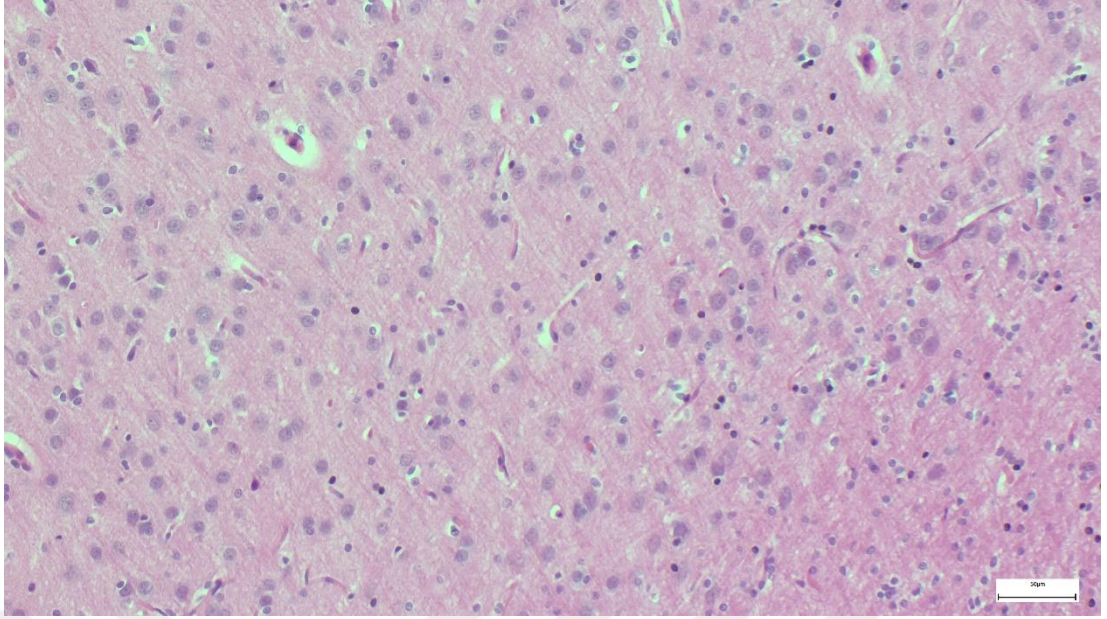
Şekil 3.19. SA grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



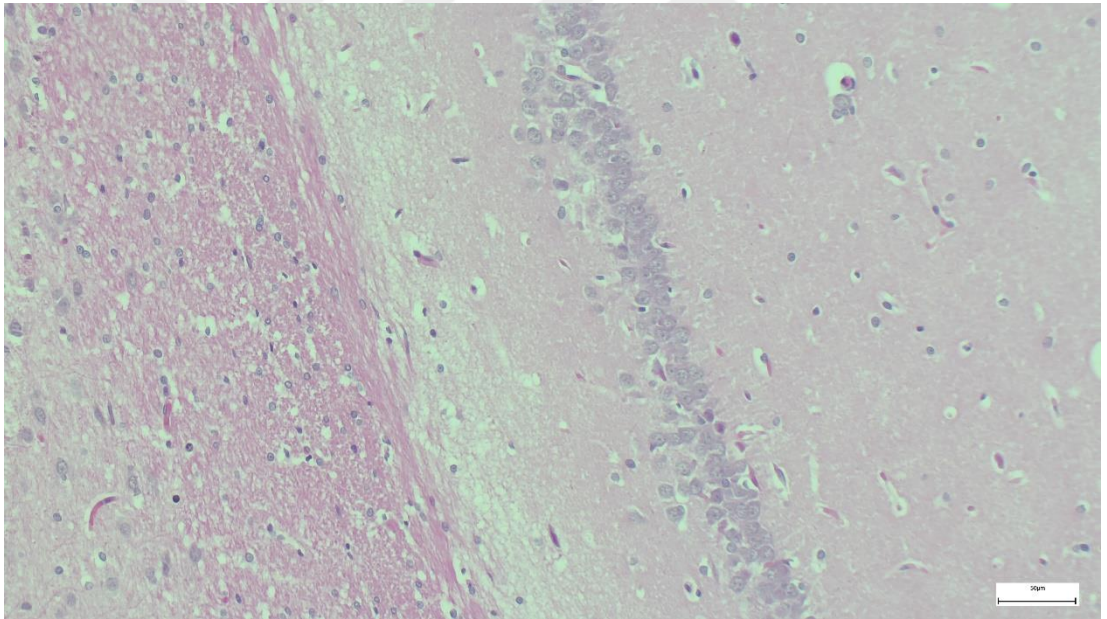
Şekil 3.20. SA grubunda hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



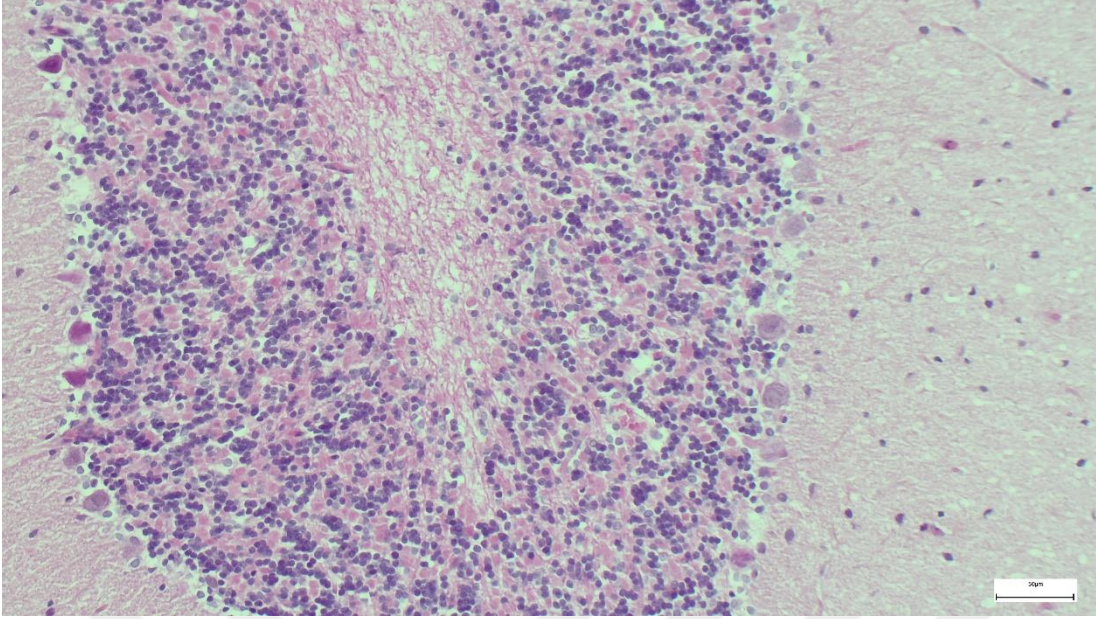
Şekil 3.21. SA grubunda beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.



Şekil 3.22. ST+SA grubunda beyin korteksi görüntüsü, HE, Bar=50µm.



Şekil 3.23. ST+SA grubu hipokampus görüntüsü, HE, Bar=50µm.



Şekil 3.24. ST+SA grubu beyincik görüntüsü, HE, Bar=50µm.

4. TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon (IR) hasarı, bir dokuya yetersiz kan akışı takiben kısa bir zaman sonra dokuya tekrar perfüzyon ile birlikte tekrar oksijenlenmenin sağlanmasıyla meydana gelir (Naito ve ark., 2020). Başka bir ifade ile iskemik dokunun tekrar kanlanmasıyla hücrel işlev bozukluğu ve ölümün paradoksal olarak şiddetlenmesi olarak tanımlanabilir. İskemik doku hasarının iyileştirilmesinde asıl hedef yeniden kanlanmanın sağlanmasıdır. Ancak, reperfüzyon kendisi paradoksal olarak bazen daha fazla hasara neden olabilmektedir. IR hasarı kalp, beyin, testis, gibi pek çok organda meydana gelebilmektedir. IR hasarı kapsamlı bir doku yıkımıyla sonuçlanan multifaktöriyel bir süreçtir ve patogenezi çok çeşitli mekanizmalar içerir (Cowled ve ark., 2011). Beyinde IR ciddi sonuçları olan geri dönüşümsüz hasara yol açabilir. Oksidatif stres, yangısal yanıt, kan-beyin bariyerinin bozulması, hücre hasarı gibi patolojik süreçler hasarın oluşmasında rol alabilir; bunlar beyin ödeme veya hemorajik dönüşüme ve sonunda nöron ölümüyle birlikte nörolojik işlev bozukluğuna neden olur (Yamato ve ark., 2003; Warach ve ark., 2004; Lin ve ark., 2016). IR hasarına neden olan mekanizmaları aydınlatmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Salminen ve ark., 1995; Wei ve ark., 2018; D'Ambrosio ve ark., 2001; Lin ve ark., 2016). Ayrıca, pek çok çalışmada hasarın azaltılmasına yönelik çeşitli terapötik yaklaşımlarda denenmiştir. İskemik hastalıklarda hem cerrahi hem de cerrahi olmayan yaklaşımlar bulunmaktadır. Cerrahi olmayan yöntemler IR hasarına neden olan yolları veya mekanizmaları hedef alarak oluşacak hasarı azaltmaya yöneliktir (Ji ve ark., 2021; Reddy ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2024).

Gelişen tedavi ve tanı yöntemlerine rağmen serebrovasküler rahatsızlıklar dünya genelinde önemli derecede mortalite ve morbiditeye sahiptir. Yapılan deneysel inme modellerinin, serebral dokuda iskemiye bağlı gelişen patolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile alakalı önemli bilgiler vermesi, yeni tedavi olanaklarına ışık tutması nedeniyle önemlidir. Tüm bu çalışmalara karşı iskemi meydana geldikten sonra tedavide başarı ihtimali sınırlıdır. İskemik dokuda dakikalar içinde ölen nöron hücreleri ve bu hücrelerin çevresinde bulunan kurtarılabilir alan tedavide hedefdir (Gündüz ve ark., 2021).

Dünya genelinde bitki bazlı ilaçlar sağlık hizmetinde önemli bir yere sahiptir. Yüzlerce yıldır farklı sağlık problemlerinin tedavi ve korunması amacıyla hemen hemen her kültür tarafından kullanılmaktadır. Bilinen ilk bitkisel kaynaklı ilaç kullanım kaydı günümüzden yaklaşık 50 asır önce Hindistan ve Çin'e dayanmaktadır. Halen bazı ülkeler, sağlık ihtiyaçları için bitkisel ilaçları kullanmaktadır. 1990'lı yıllardan bu yana, tamamlayıcı ve alternatif tıp kullanımı üzerine yapılan ulusal çalışmalardan sonra ABD'de bitkisel ilaçların kullanımı her geçen gün artmaktadır (Eisenberg ve ark., 1993, Eisenberg ve ark., 1998, Rivera ve ark., 2013).

Sinapik asit, meyveler, sebzeler, tahıl taneleri gibi pek çok bitkide bulunabilir. Bir hidrokisisinnamik asit türevi olan sinapik asit Brassicaceae türlerinde doğal olarak oluşur (Nićiforović ve Abramovič, 2014). Sinapik asiti antioksidan (Chen, 2016; Nithya ve Subramanian, 2017), antimikrobiyal (Gurbuzer, 2021), anti-inflamatuvar (Zhang ve ark., 2017), antikanser (Taştemur ve ark., 2023) ve anti-anksiyete (Yoon ve ark., 2007) aktivitesi gösterir. Sinapik asidin bir kolin esteri olarak Sinapinin Brassicaceae familyasında, özellikle de kolza tohumu ve hardalda önemli miktarlarda bulunur (Liu ve ark., 2024). Sinapin antioksidan (Bouulghobra ve ark., 2020), asetilkolinesteraz inhibitör (Yates ve ark., 2019), antikanser (Wang ve ark., 2022; Yang ve ark., 2023), karaciğer koruyucu (Fu ve ark., 2016), anti-inflamatuvar (Lee ve ark., 2021) hipertansif endotelial hasar koruyucu (Liu ve ark., 2021) gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Her iki bileşikte sahip oldukları aktiviteler nedeniyle gıda işleme, kozmetik ve ilaç endüstrisinde potansiyel kullanımı olabilmektedir.

Sinapik asitin böbrek, kalp, testis gibi çeşitli organların IR hasar modellerinde etkisi araştırılmıştır. Bu hasar modellerinde sinapik asit organların hasarını, morfolojik değişiklikleri, enflamasyonu, oksidatif stresi ve hücre ölümünü azaltmıştır (Unsal ve ark., 2021A, B; Silambarasan ve ark., 2015). Potansiyel nöroprotektif etkilerinin incelendiği global serebral iskemi hayvan modelinde sinapik asidin özellikle iskemik hipokampal nöronlar için önemli nöroproteksiyon sağladığı görülmüştür (Kim ve ark., 2011). Sinapin tiyosiyanat, sinapik asidin kolin esteri olan sinapinin bir tuzudur. Yapılan literatür taramasında Sinapin tiyosiyanatın herhangi bir organ IR hasar modelinde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışma Sinapin tiyosiyanatın serebral IR modelinde etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Reaktif oksijen türleri (ROS) lipid peroksidasyon yoluyla hücrel membranlara doğrudan zarar verirler. ROS kaynaklı serebral IR hasarın azaltılması için antioksidan aktiviteye sahip bazı maddeler koruyucu olarak kullanılmıştır (Briones-Valdivieso ve ark., 2024; Wu ve ark., 2020; Hou ve Brenner, 2024). Güçlü antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin kaynakları genellikle bitkilerdir (Xu ve ark., 2017; Godlewska ve ark., 2023). Bitkilerde bulunan bu doğal bileşikler antioksidan aktivitelerinin yanı sıra pek çok sinyal yolağını düzenleyerek IR hasarını azaltabilmektedir (Ajzashokouhi ve ark., 2023; Xie ve ark., 2021). IR modelinde TOS, TAS, MDA gibi parametrelerin ölçümü antioksidan maddelerin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olup olmayacağını değerlendirilmesinde önemli bir belirteçlerdir (Altintas ve ark., 2016). OSI değeri, organizmanın mevcut antioksidan bileşiklerini kullanarak fiziksel ve çevresel etkiler tarafından oluşturulan oksidan bileşiklere karşı tolerans yüzdesini ifade eder. Oksidatif stresin değerlendirilmesi için kullanılan OSI, TOS'un TAS'a oranıdır (Bal ve ark., 2019; Akpınar Oruç ve ark., 2023). MDA oksidatif stresi gösteren diğer bir belirteç olup, hücre membranında bulunan fosfolipitlerin yıkılması neticesinde lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan son üründür (Lorente ve ark., 2015). MDA artışı, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ve hiperoksidatif koşullarının meydana geldiğini gösterir (Sagita ve ark., 2022). Bu çalışmada, sinapik asit ve Sinapin tiyosiyanatın serebral IR modelinde antioksidan etkilerini incelemek TAS, TOS, MDA, GSH parametrelerini değerlendirildi (Tablo 1).

Bu çalışmada, CCA grubundaki hayvanların beyin dokusunda diğer gruplara nazaran TAS ve GSH değerlerinde bir düşüş görüldü ($p>0,05$). TOS değeri bakımından kontrol grubuna kıyasla CCA grubu göre yüksek bulundu ($p<0,05$). CCA uygulaması beyin dokusunda MDA değerini arttırdı ($p<0,001$). CCA grubunda OSI değeri diğer çalışma gruplarına kıyasla yüksek bulundu ($p<0,001$). Bu sonuçlar beyin IR hasar modeli oluşturan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Arslan ve ark., 2019; Oruc ve ark., 2016, Wang ve ark., 2010; Aslan ve ark., 2021; Akpınar Oruç ve ark., 2023). SA, ST ve SA+ST uygulaması beyin IR'da artış MDA seviyesi ($p>0,05$) ve OSI değerinde azalmaya neden oldu ($p<0,001$). Sinapik asitin ve/veya sinapin tiyosiyanatın bu etkileri radikal süpürücü etkisine bağlanabilir. Bu sinapik asitin ve sinapin tiyosiyanatın iskemik beyinde antioksidan sistem dengesini tekrar sağladığını gösterebilir. Yapılan çok sayıda çalışma sinapik asidin ve sinapin tiyosiyanatın

radikal süpürücü aktiviteleri ile oksidatif stres hasarını azaltabileceğini göstermiştir (Unsal ve ark., 2021A, B; Silambarasan ve ark., 2015; Kim ve ark., 2011; Hua ve ark., 2021; Boulghobra ve ark., 2020). Bu çalışmanın sonuçları sinapik asitin ve sinapin tiyosiyanatın oksidatif hasara karşı koruyucu etkisini doğrulamaktadır. Ayrıca, histopatolojik bulgularımız biyokimyasal sonuçları desteklemektedir. Sonuç olarak ilgili bileşiklerin antioksidatif etkisiyle beyin hasarını hafifletebildiği görülmüştür.

Astrosit hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun olarak bulunan ve intraselüler bir protein olan GFAP ilk olarak 1971 yılında tanımlanmıştır (Gomi ve ark., 1995; Schiff ve ark., 2012; Eng, 1995). Astrositler, serebral iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında, hipertrofik ve ödemli astrosit gövdeleri, artmış ve genişlemiş apoptoz ve immünohistokimyasal boyama ile gösterilen gelişmiş GFAP ekspresyonu ile yansıtılan şekilde aktive olurlar. Bir çalışmada, Kemik morfogenetik protein 7 (BMP7)'nin serebral iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası sıçanların beyin dokusunda GFAP ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırılmıştır. GFAP ekspresyonunun serebral iskemi sonrasında arttığı ve esas olarak iskemik korteks, korpus striatum ve hipokampusta dağıldığı belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, BMP7 tedavi grubunda GFAP ekspresyonu artmıştır ($P<0.01$). Araştırmacılar BMP7'nin GFAP ekspresyonunu artırarak hayvanları iskemi-reperfüzyon hasarına karşı korumak için nöral rejenerasyonu teşvik edebileceğini bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2013).

GFAP beyine özgüdür ve normal şartlar altında periferik kanda rastlanmaz. Astrosit hücrelerinin ölümü ile birlikte periferik kana geçtiği için beyin hasarı durumlarında parametre olarak kabul edilmektedir (Schiff ve ark., 2012). Spesifik olarak inme ve travmaya bağlı beyin hasarı gibi beyin hasarına sebep olan durumlarda salınımı artış göstermektedir. Aynı zamanda iskemik inme ile alakalı hastanın durum seyri değerlendirilmesinde de kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda GFAP miktarı iskemik inme durumlarında, hastalığın sinir hücrelerine etki hacmi ve bu hücrelerde meydana gelen defisit ile ilişkili bulunmuştur (Wunderlich ve ark., 2006).

Wiesmann ve arkadaşlarının (2010) yapmış oldukları çalışmada, GFAP parametresinin kranial travmayı takiben yükseldiği ve travmanın şiddetini yansıttığı bildirilmiştir. Singh ve arkadaşlarının (2016) travmatik beyin hasarı hastaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada GFAP ile yaralanma şiddet ve sonucu arasında ilişki

olduğu bildirilmiştir. Üstteki çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da IR hasarında serum GFAP değerleri yükseldi. Ayrıca, histopatolojik inceleme IR hasarı oluşturulan hayvanlarda dejeneratif nöron yüzdesi de yükseliş gösterdi. Bu dejeneratif nöron yüzdesindeki yükseliş GFAP değerinin yükselişi ile ilişkili olabilir. IR hasarı oluşturulan hayvanlara SA, ST ve SA+ST uygulaması artmış GFAP değerini ($p<0,001$) düşürdü. Bu durum ilgili bileşiklerin IR hasarını hafifletmesinden kaynaklanabilir. Histopatolojik sonuçlar da SA ve ST'nin beyin hasarını azalttığını doğrulamaktadır.

Glikolitik enzim enolazın dimerik izoformu olan Nöron Spesifik Enolaz (NSE) yaklaşık olarak 78 kiloDalton (kDa) molekül ağırlığa sahiptir. NSE normal koşullarda salgılanmaz fakat aksonların hasar görmesi sonucunda optimal homeostazın devam etmesi için NSE üretimi artar. NSE'nin serum konsantrasyonları travmatik beyin hasarından ve beyin hasarına yol açan klinik durumlardan sonra artar (De Kruijk ve ark., 2001; Alpdemir ve ark., 2019). Bu sebeple NSE direkt nöronlarda meydana gelen işlevsel hasarı değerlendirmek için kullanılan önemli bir belirteçtir. Ayrıca NSE hasta prognozu ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir (Cheng ve ark., 2014).

İlzecki ve arkadaşları (2016) çalışmalarında karotis endarterektomi (CEA) uygulanan hastalarda CEA'dan 48 saat sonra serumda ölçülen NSE düzeyinin ameliyattan 24 saat önceki ve 12 saat sonraki seviyeler ile karşılaştırdıklarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar NSE'nin beyin IR hasarında biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Serebral IR sonrası sıçanlarda beyin dokusunda NSE ekspresyonu üzerine nörogulin-1beta'nın (NRG-1beta) etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, NSE immünoreaksiyonu serebral iskemi insultunun erken evresinde geçici olarak yükselmiş ve ardından kontrol grubunda kademeli olarak azalmıştır. NRG-1beta uygulaması NSE seviyesini önemli ölçüde artırmış ve böylece nöron hasarının zamanını ve derecesini geciktirmiştir (Li ve ark., 2009). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar örnek çalışmalar ile desteklenir nitelikte, çalışma grubuna kıyasla NSE düzeyleri CCA grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$). SA, ST ve SA+ST uygulaması IR'de artmış NSE düzeylerini düşürdü ($p<0,001$). İlgili bileşikler IR'de oluşan doku hasarını baskıladığı için NSE değerini düşürmüş olabilir. Bu sonuçları histopatolojik inceleme sonuçları da doğrulamaktadır. İlginç bir şekilde sağlıklı hayvanlarda bileşiklerin tek

başına kullanımı NSE ve GFAP değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseltti ($p<0,001$). Bu bileşikler bu proteinlerin ekspresyonunu tetikleyen yolları aktive etmiş olabilir. Bunun mekanizmasını araştırmaya yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, gruplara göre beyin korteksi, beyincik ve hipokampusların histopatolojik skorları ile beyin korteksinde dejeneratif piremidal nöron yüzdeleri hesaplandı. Kontrol, ST, SA ve SA+ST verilen gruplardaki hayvanlarda normal doku histolojisi gözlemlendi. Serebral IR hasarı oluşturulan ratların beyin, hipokampus ve beyinciklerinde hiperemi, nöronal dejenerasyon, nöronofaji ve belirgin ödem gözlemlendi. SA, ST ve SA+ST'nin IR hasarında oluşan bulguları azalttığı gözlemlendi. Benzer bulgular serebral IR modeli oluşturan diğer araştırmalarda da gözlenmiştir (Özbal ve ark., 2008; Turkmen ve ark., 2015, 2016). Bu çalışmada, SA, ST ve SA+ST uygulaması IR modelinde oluşan hasarı azalttı. Histopatolojik sonuçlar biyokimyasal sonuçları doğrulamaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada SA, ST ve SA+ST uygulaması' nın sıçanlarda serebral IR hasarı üzerinde önemli bir önleyici etkiye sahip olduğu tespit edildi. Güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olan bu bileşikler, IR kaynaklı oksidatif stresi azaltarak koruyucu etki göstermiş olabilir. Bu bileşiklerin serebral IR hasarındaki koruyucu etkinliğini araştırmak için klinik çalışmaların yanı sıra ek hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Daha ileri çalışmalar, ilgili bileşiklerin serebral IR hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin çeşitli mekanizmalar ve doz-yanıt çalışmaları ile araştırılmasına odaklanmalıdır.

KAYNAKLAR

Af, E., Ak, S. (2019). Natural lip morphometry among young adults. *Anatomy: International Journal of Experimental & Clinical Anatomy*,

Ajzashokouhi, A. H., Rezaee, R., Omidkhoda, N. ve Karimi, G. (2023). Natural compounds regulate the PI3K/Akt/GSK3 β pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cell Cycle*, 22(7), 741-757.

Akkoç, H. (2008). Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(3), 211-215.

Oruc, O. A., Boyaci, M. G., Ozdinc, Ş., Celik, S., & Aslan, E. (2023). Protective effect of valproic acid on ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in a rat model. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 1-8.

Alisik, M., Neselioglu, S. ve Erel, O. (2019). A colorimetric method to measure oxidized, reduced and total glutathione levels in erythrocytes. *Journal of Laboratory Medicine*, 43(5), 269-277.

Alpdemir, M., Özcan, O., Alpdemir, M. F., Şeneş, M., Azak, A., Duranay, M., & Yücel, D. (2019). Serum neuron specific enolase and S-100B levels in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *European Archives of Medical Research*, 35(2), 83-87.

Altintas, Ö., Kumas, M. ve Altintas, M. O. (2016). Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of adropin and oxidative markers against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *Peptides*, 79, 31-38.

An, M. ve Shaughnessy, M. (2011). The effects of exercise-based rehabilitation on balance and gait for stroke patients: a systematic review. *Journal of Neuroscience Nursing*, 43(6), 298-307.

Anaya-Prado, R., ve Toledo-Pereyra, L. H. (2002). The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. In *Transplantation proceedings* (Vol. 34, No. 7, pp. 2518-2519).

Arıncı, K. ve Elhan, A. (2006). *Anatomi*. Ankara: Güneş Kitabevi.

Arnold, S. A., Platt, S. R., Gendron, K. P. ve West, F. D. (2020). Imaging ischemic and hemorrhagic disease of the brain in dogs. *Frontiers In Veterinary Science*, 7, 279.

Arslan, E. A., Arslan, E., Yaman, S. Ö. ve Karahan, S. C. (2019). The effects of edaravone on experimental brain ischemia/reperfusion injury in rats. *Haydarpasa Numune Medical Journal*, 59, 197-202.

- Aslan, E., Boyacı, M. G., Güzel, H. ve Pektaş, M. B. (2021). Better neuroprotective profile of caffeic acid phenyl ester over resveratrol in non-traumatic ischemia-reperfusion injury of the spinal cord. *British Journal of Neurosurgery*, 1-7.
- Bacigaluppi, M., Comi, G. ve Hermann, D. M. (2010). Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The Open Neurology Journal*, 4, 34.
- Bacigaluppi, M., Comi, G. ve Hermann, D. M. (2010). Animal models of ischemic stroke. Part one: modeling risk factors. *The Open Neurology Journal*, 4, 26.
- Bal, C., Sevindik, M., Akgul, H. ve Selamoglu, Z. (2019). Oxidative stress index and antioxidant capacity of *Lepista nuda* collected from Gaziantep/Turkey. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 37(1), 1-5.
- Ballestín, A., Casado, J. G., Abellán, E., Vela, F. J., Álvarez, V., Usón, A. ve Sánchez-Margallo, F. M. (2018). Ischemia-reperfusion injury in a rat microvascular skin free flap model: a histological, genetic, and blood flow study. *Plos One*, 13(12), e0209624.
- Bhinu, V. S., Schäfer, U. A., Li, R., Huang, J. ve Hannoufa, A. (2009). Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in *Brassica napus*. *Transgenic Research*, 18, 31-44.
- Boulghobra, D., Grillet, P. E., Laguerre, M., Tenon, M., Fauconnier, J., Fanc-Berthon, P. ve Cazorla, O. (2020). Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Redox Biology*, 34, 101554.
- Boz, H. (2015). Sinapic acid in cereals. *GIDA - Journal of Food*, 40(1), 55-60. <https://doi.org/ref.46>
- Böhmer, A. E., Oses, J. P., Schmidt, A. P., Perón, C. S., Krebs, C. L., Oppitz, P. P. ve Stefani, M. A. (2011). Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 68(6), 1624-1631.
- Bradford, M. M. (1976). Foreign patent documents. *Biochemistry*, 72, 248-254.
- Briones-Valdivieso, C., Briones, F., Orellana-Urzúa, S., Chichiarelli, S., Saso, L. ve Rodrigo, R. (2024). Novel Multi-Antioxidant Approach for Ischemic Stroke Therapy Targeting the Role of Oxidative Stress. *Biomedicines*, 12(3), 501.
- Chan, W. C. Ve Au-Yeung, S. S. (2018). Recovery in the severely impaired arm post-stroke after mirror therapy: a randomized controlled study. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 97(8), 572-577.
- Chen, C. (2016). Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 3571614.
- Cheng, F., Yuan, Q., Yang, J., Wang, W. ve Liu, H. (2014). The prognostic value of serum neuron-specific enolase in traumatic brain injury: systematic review and meta-analysis. *Plos One*, 9(9), e106680.

Cheng, X., Zhang, F., Li, J. ve Wang, G. (2019). Galuteolin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via anti-apoptotic, anti-oxidant, and anti-inflammatory mechanisms. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2671-2680.

Cirak, B., Inci, S., Palaoglu, S. ve Bertan, V. (2003). Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta*, 327(1-2), 103-107.

Cochran, P. E. (2011). *Veterinary anatomy and physiology: A clinical laboratory manual* (2nd ed.) (ISBN-13: 978-1-4354-6433-9).

Coşkun, A. (2022). Sıçanlarda Sinapik Asit Uygulamasının Penisilin ile Oluşturulmuş Epileptiform Aktivite Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Düzce*.

Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/>

D'Ambrosio, A. L., Pinsky, D. J. and Connolly, E. S. (2001). The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Molecular Medicine*, 7, 367-382.

Dağlı, H. (2017). Sinapik Asitin D17 Köpek Osteosarkom Hücre Hattında Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya*.

De Kruijk, J. R., Leffers, P., Menheere, P. P. C. A., Meerhoff, S. ve Twijnstra, A. (2001). S- 100B and neuron- specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients A comparison with healthy controls. *Acta Neurologica Scandinavica*, 103(3), 175-179.

Demir, E. A. (2019). Over, böbrek ve beyinde iskemi/reperfüzyon sonrası redoks dengesi ve Tribulus terrestris L.'nin etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 46(3), 525-534.

Deveci, A., Nur, G., Kırpık, M., Harmanakaya, A. ve Yıldız, Y. (2016). Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 26-32.

Doğan, Z. (2012). Gebe ratlardasiprofloksasin kullanımının fetal beyin gelişimi ve morfolojik yapı üzerine etkilerinin araştırılması: Quercetin'in olası koruyucu rolünün belirlenmesi (Doctoral dissertation, Doktora Tezi).

Doyle K.P., Simon R.P, ve Stenzel-Poore M.P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 55(3), 310-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.

Durukan, A. ve Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87(1), 179-197.

- Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M. ve Kessler, R. C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *Jama*, 280(18), 1569-1575.
- Eisenberg, D. M., Kessler, R. C., Foster, C., Norlock, F. E., Calkins, D. R. ve Delbanco, T. L. (1993). Unconventional medicine in the United States--prevalence, costs, and patterns of use. *New England Journal of Medicine*, 328(4), 246-252.
- Ekici, L. ve Sağdıç, O. (2008). Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda*, 33(5), 251-260.
- El-Koussy, M., Schroth, G., Brekenfeld, C. ve Arnold, M. (2014). Imaging of acute ischemic stroke. *European Neurology*, 72(5-6), 309-316.
- Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 8, 203-214.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Fluri, F., Schuhmann, M. K. ve Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug design, Development and Therapy*, 3445-3454.
- Frizzell, J. P. (2005). Acute stroke: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *AACN Advanced Critical Care*, 16(4), 421-440.
- Fu, K., Chen, M., Zheng, H., Li, C., Yang, F. ve Niu, Q. (2021). Pelargonidin ameliorates MCAO-induced cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by the action on the Nrf2/HO-1 pathway. *Translational Neuroscience*, 12(1), 020-031.
- Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., Peng, T. ve Chen, F. (2016). Hepatoprotection using *Brassica rapa* var. *rapa* L. seeds and its bioactive compound, sinapine thiocyanate, for CCl4-induced liver injury. *Journal of Functional Foods*, 22, 73-81.
- Garosi, L. S. (2010). Cerebrovascular disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(1), 65-79.
- GİRGIN A. (2016) Sinir Sistemi, İçinde A. ÖZER (Edt.) Veteriner Özel Histoloji, (ss. 1-24), Bursa: Dora.
- Godlewska, K., Pacyga, P., Najda, A. ve Michalak, I. (2023). Investigation of Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Biologically Active Plant-Derived Natural Products. *Molecules*, 28(14), 5572.

Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T. ve Itohara, S. (1995). Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*, 14(1), 29-41.

Guan, H., Lin, Q., Ma, C., Ju, Z., & Wang, C. (2022). Metabolic profiling and pharmacokinetic studies of sinapine thiocyanate by UHPLC-Q/TOF-MS and UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 207, 114431.

Guo, Y., Ding, Y., Zhang, T. ve An, H. (2016). Sinapine reverses multi-drug resistance in MCF-7/dox cancer cells by downregulating FGFR4/FRS2 α -ERK1/2 pathway-mediated NF- κ B activation. *Phytomedicine*, 23(3), 267-273.

Gurbuzer, A. (2021). Investigation of in vitro antimicrobial activities of some hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids commonly found in medicinal and aromatic plants. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 1(1), 42-47.

Gutteridge, J. M. ve Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.

Gündüz, Z. B., Aktas, F., Vatansev, H., Solmaz, M. ve Erdoğan, E. (2021). Effects of amantadine and topiramate on neuronal damage in rats with experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Advances In Clinical and Experimental Medicine*, 30(10), 1013-1023.

Hameed, H. (2014). Evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of sinapic acid.

Harma, M. ve Erel, O. (2003). Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Medical Weekly*, 133(4142), 563-566.

Hong, Z., Sui, M., Zhuang, Z., Liu, H., Zheng, X., Cai, C. ve Jin, D. (2018). Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation on lower limbs of patients with hemiplegia after chronic stroke: a systematic review. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 99(5), 1011-1022.

Hou, Z. ve Brenner, J. S. (2024). Developing targeted antioxidant nanomedicines for ischemic penumbra: Novel strategies in treating brain ischemia-reperfusion injury. *Redox Biology*, 103185.

Hua, H., Zhang, W., Li, J., Li, J., Liu, C., Guo, Y. ve Qian, H. (2021). Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion by dietary phytochemical extracts from Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113410.

Ilzecki, M., Ilzecka, J., Przywara, S., Terlecki, P., Grabarska, A., Stepulak, A., ve Zubilewicz, T. (2016). Serum neuron-specific enolase as a marker of brain ischemia-reperfusion injury in patients undergoing carotid endarterectomy. *Acta Clinica Croatica*, 55(4), 579-584.

Ji, Y. B., Gao, Q., Tan, X. X., Huang, X. W., Ma, Y. Z., Fang, C. ve Chang, J. (2021). Lithium alleviates blood-brain barrier breakdown after cerebral ischemia and

reperfusion by upregulating endothelial Wnt/ β -catenin signaling in mice. *Neuropharmacology*, 186, 108474.

Jurcau, A. ve Simion, A. (2021). Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 14.

Jurcau, A. ve Simion, A. (2021). Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 14.

Kahraman, E. (2014). Myokardial iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine rivaroksabann etkileri.

Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. ve Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317.

Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. ve Korthuis, R. J. (2016). Ischemia/reperfusion. *Comprehensive Physiology*, 7(1), 113.

Karbowski, J. (2011). Scaling of brain metabolism and blood flow in relation to capillary and neural scaling. *Plos One*, 6(10), e26709.

Keleştemur, G. T. ve Özdemir, Y. (2011). Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 69-73.

Kılınçarslan, G. (2019). Fizyolojik özel dolaşım ve egzersiz. *Herkes için Spor Ve Rekreasyon Dergisi*, 1(1), 1-10.

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Buket FİDANCI Yüksek Lisans Tezi <https://acikerisim.kku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12587/18675>

Kim, K. H. Ve Jang, S. H. (2021). Effects of task-specific training after cognitive sensorimotor exercise on proprioception, spasticity, and gait speed in stroke patients: A randomized controlled study. *Medicina*, 57(10), 1098.

Kim, Y. O., Lee, S. W., Oh, M. S. ve Lee, H. J. (2011). Effects of sinapic Acid of 4 vessel occlusion model-induced ischemia and cognitive impairments in the rat. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 9(2), 86.

Koca, N. ve Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda*, 30(4).

Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E. ve Selek, S. (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, 100(1), 61-64.

Küpeli, A. (2019). İnme Hastalarında Gövdenin Kısıtlanmış Pozisyonunda Verilen Uzanma Aktivitelerinin Üst Ekstremitte Fonksiyonları Üzerine Etkisinin Araştırılması.

- Larkin, J. R., Simard, M. A., Khrapitchev, A. A., Meakin, J. A., Okell, T. W., Craig, M. ve Sibson, N. R. (2019). Quantitative blood flow measurement in rat brain with multiphase arterial spin labelling magnetic resonance imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(8), 1557-1569.
- Lee, E. H., Shin, J. H., Kim, S. S. ve Seo, S. R. (2021). Sinapic acid controls inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Cells*, 10(9), 2327.
- Li, Q., Zhang, R., Ge, Y. L., Mei, Y. W. ve Guo, Y. L. (2009). Effects of neuregulin on expression of MMP-9 and NSE in brain of ischemia/reperfusion rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, 38, 207-215.
- Li, Y. ve Zhang, J. (2021). Animal models of stroke. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), 204-219.
- Li, Y., Yang, W., Zhu, Q., Yang, J. ve Wang, Z. (2015). Protective effects on vascular endothelial cell in N'-nitro-L-arginine (L-NNA)-induced hypertensive rats from the combination of effective components of *Uncaria rhynchophylla* and *Semen Raphani*. *BioScience Trends*, 9(4), 237-244.
- Li, Y., Zhang, X., Yang, W., Li, C., Chu, Y., Jiang, H. ve Shen, Z. (2017). Mechanism of the protective effects of the combined treatment with *rhynchophylla* total alkaloids and sinapine thiocyanate against a prothrombotic state caused by vascular endothelial cell inflammatory damage. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3081-3088.
- Lin, L., Wang, X., & Yu, Z. (2016). Ischemia-reperfusion injury in the brain: Mechanisms and potential therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol* (Los Angel), 5(4), Article 213. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000213>
- Liu Y, Yin H-l, Li C, Jiang F, Zhang S-j, Zhang X-r ve Li Y-l (2021). Sinapine Thiocyanate Ameliorates Vascular Endothelial Dysfunction in Hypertension by Inhibiting Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Front Pharmacology*. 11, 620159.
- Liu, M., Zhang, C., Liu, W., Luo, P., Zhang, L., Wang, Y. ve Fei, Z. (2015). A novel rat model of blast-induced traumatic brain injury simulating different damage degree: implications for morphological, neurological, and biomarker changes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 168.
- Liu, Y., Yin, H. L., Li, C., Jiang, F., Zhang, S. J., Zhang, X. R. ve Li, Y. L. (2021). Sinapine thiocyanate ameliorates vascular endothelial dysfunction in hypertension by inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 620159.
- Liu, Z., Sun, T., Liu, J., Liang, N. ve Zhao, L. (2024). Natural deep eutectic solvent as a green extraction medium for the ultrasonic-assisted extraction of sinapine thiocyanate from black mustard seeds. *Microchemical Journal*, 201, 110549.
- Lorente, L., Martin, M. M., Abreu-Gonzalez, P., Ramos, L., Argueso, M., Caceres, J. J. ve Jiménez, A. (2015). Association between serum malondialdehyde levels and

mortality in patients with severe brain trauma injury. *Journal of Neurotrauma*, 32(1), 1-6.

Low, P., Molnár, K., ve Kriska, G. (2016). Atlas of animal anatomy and histology. (ISBN 978-3-319-25172-1 (eBook)).

Manual, W. S. S. (2006). the WHO STEPwise approach to stroke surveillance. Geneva: World Health Organization, 96.

Mattila, P ve Kumpulainen J. (2002). Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,3660-3667.

Maynard, R. L. ve Downes, N. (2019). Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research (ISBN: 978-0-12-811837-5).

McConnell, J. F., Garosi, L. ve Platt, S. R. (2005). Magnetic resonance imaging findings of presumed cerebellar cerebrovascular accident in twelve dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 46(1), 1-10.

Mijajlović, M. D., Pavlović, A., Brainin, M., Heiss, W. D., Quinn, T. J., Ihle-Hansen, H. B. ve Bornstein, N. M. (2017). Post-stroke dementia—a comprehensive review. *BMC Medicine*, 15, 1-12.

Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M. ve Turner, M. B. (2016). Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *circulation*, 133(4), e38-e360.

Musuka, T. D., Wilton, S. B., Traboulsi, M. ve Hill, M. D. (2015). Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *Canadian Medical Association Journal*, 187(12), 887-893.

Naito, H., Nojima, T., Fujisaki, N., Tsukahara, K., Yamamoto, H., Yamada, T. ve Nakao, A. (2020). Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine. *Acute Medicine and Surgery*, 7(1), e501.

Netter, F. H. (2006). Atlas of human anatomy. 6th Ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Nićiforović N, Abramović H. (2014). Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 34–51.

Nithya, R. and Subramanian, S. (2017). Antioxidant properties of sinapic acid: In vitro and in vivo approach. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(6), 255.

Northern Manhattan Stroke Study Collaborators, Sacco, R. L., Boden-Albala, B., Gan, R., Chen, X., Kargman, D. E. ve Hauser, W. A. (1998). Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *American Journal of Epidemiology*, 147(3), 259-268.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.

Oruç, S., Gönül, Y., Tunay, K., Oruç, O. A., Bozkurt, M. F., Karavelioğlu, E. ve Çelik, S. (2016). The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats. *Life Sciences*, 154, 79-86.

Özalp, E. (2007). Tiyosiyanat Bellekli Polimer Sistemlerinin Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. *Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.

Özbal, S., Erbil, G., Koçdor, H., Tuğyan, K., Pekçetin, Ç. ve Özoğul, C. (2008). The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neuroscience Letters*, 438(3), 265-269.

Piper, H. M., Meuter, K. ve Schäfer, C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 75(2), S644-S648.

Przykaza, Ł. (2021). Understanding the connection between common stroke comorbidities, their associated inflammation, and the course of the cerebral ischemia/reperfusion cascade. *Frontiers in Immunology*, 12, 782569.

Qun, L. ve Ruiqi, G. (1999). Cruciferous bitkilerden elde edilen sinapinin *Drosophila melanogaster*'in ömrü üzerindeki etkileri. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 5(01), 32-35.

Reddy, M. K. ve Labhassetwar, V. (2009). Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, 23(5), 1384-1395.

Rivera, J. O., Loya, A. M. ve Ceballos, R. J. A. I. M. (2013). Use of herbal medicines and implications for conventional drug therapy medical sciences. *Alternative and Integrative Medicine*, 2(6), 1-6.

Ross, H.M. ve Pawlina, W. (2014) Histoloji konu anlatımı ve atlas ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile (Çev: Baykal B.). Ankara: Palme Yayıncılık.

Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A. ve Vinters, H. V. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44(7), 2064-2089.

Sagita, M. B., Turchan, A., Utomo, B., Al Fauzi, A. ve Fauziah, D. (2022). Expression malondialdehyde (MDA) of brain after injury with the extract of Kencur (*Kaempferia Galanga L*): experimental study Wistar Rats. *International Journal of Health and Medical Sciences*, 5(1), 114-121.

Salminen, A., Liu, P. K., & Hsu, C. Y. (1995). Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat-brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(3), 939-944.

SAMUELSON, D.A. 2007 Textbook of Veterinary Histology China: Saunders Elsevier.

Schiff, L., Hadker, N., Weiser, S. ve Rausch, C. (2012). A literature review of the feasibility of glial fibrillary acidic protein as a biomarker for stroke and traumatic brain injury. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 16, 79-92.

Shi, M., Chen, J., Liu, T., Dai, W., Zhou, Z., Chen, L. ve Xie, Y. (2022). Protective effects of remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis. *Drug design, Development and Therapy*, 413-423.

Silambarasan, T., Manivannan, J., Priya, M. K., Suganya, N., Chatterjee, S. ve Raja, B. (2015). Sinapic acid protects heart against ischemia/reperfusion injury and H9c2 cardiomyoblast cells against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(4), 853-859.

Singh, K., Trivedi, R., Devi, M. M., Tripathi, R. P. ve Khushu, S. (2016). Longitudinal changes in the DTI measures, anti-GFAP expression and levels of serum inflammatory cytokines following mild traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 275, 427-435.

Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 245-261.

Summers, B. A., Cummings, J. F. and De Lahunta, A. (1995). Central nervous system hypoxia, ischemia, and related disorders. *Veterinary Neuropathology*, 237-249.

Svetlov, S. I., Prima, V., Glushakova, O., Svetlov, A., Kirk, D. R., Gutierrez, H. Ve Hayes, R. L. (2012). Neuro-glial and systemic mechanisms of pathological responses in rat models of primary blast overpressure compared to “composite” blast. *Frontiers in Neurology*, 3, 15.

Şahin, A. D., Yusuf, Ü., Derya, I., Öztaş, D., Eray, İ. K. ve Uğurlu, M. (2015). Serebrovasküler hastalık geçiren hastaların demografik özellikleri ve birinci basamak sağlık merkezlerinde önlenilebilir risk faktörlerinin yönetimi. *Ankara Medical Journal*, 15(4).

Taner, D. (1998). Fonksiyonel Nöroanatomi. METU Press, Ankara.

Taştemur, Ş., Hacısüleyman, L., Karataş, Ö., Yulak, F. ve Ataseven, H. (2023). Anticancer activity of sinapic acid by inducing apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 101(7), 361-368.

Thrane, A. S., Skehan, J. D. ve Thrane, P. S. (2007). A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Medical Hypotheses*, 68(6), 1363-1370.

Toklu, H., Deniz, M., Yüksel, M., Keyer-Uysal, M. ve Şener, G. (2015). Serebral İskemi/Reperfüzyona Bağlı Oksidan Beyin Hasarına Karşı Melatonin ve Amlodipinin Koruyucu Etkileri. *Marmara Medical Journal*, 22(1), 34-44.

Treuting, P. M., Dintzis, S. M. ve Montine, K. S. (Eds.). (2018). Comparative anatomy and histology: A mouse, rat, and human atlas (ISBN: 978-0-12-802900-8).

Turkmen, S., Eryigit, U., Karaca, Y., Mentese, A., Sumer, U. A., Yulug, E. ve Gunduz, A. (2015). Diagnostic value of plasma signal peptide-Cub-Egf domain-containing protein-1 (SCUBE-1) in an experimental model of acute ischemic stroke. *The American Journal of Emergency Medicine*, 33(2), 262-265.

Uludağ, S. (2017). Rat hipokampusunde akrilamidin oluşturduğu toksik etkiye karşı zerdeçalın koruyucu etkisinin mikroanatomik olarak incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Unekawa, M., Tomita, M., Tomita, Y., Toriumi, H., Miyaki, K. ve Suzuki, N. (2010). RBC velocities in single capillaries of mouse and rat brains are the same, despite 10-fold difference in body size. *Brain Research*, 1320, 69-73.

Unsal, V., Kolukcu, E., Firat, F. ve Gevrek, F. (2021A). The protective effects of sinapic acid on acute renal ischemia/reperfusion injury. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(5), 563-571.

Unsal, V., Kolukcu, E., Gevrek, F. ve Firat, F. (2021B). Sinapic acid reduces ischemia/reperfusion injury due to testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, 53(8), e14117.

Victor, M. ve Ropper, A. H. (2001). Cerebrovascular diseases. In M. J. Wonsiewicz, M. P. Medina, & M. Navrozov (Eds.), *Adams and Victor's Principles of Neurology* (pp. 821-924). McGraw-Hill.

Wang, J. Zeng, Z., Lei, S., Han, J., Liao, S., Zhang, J., Wang, Ju., Dong, Y., Li, H. ve Chen, T. (2022). Sinapine Thiocyanate Inhibits the Proliferation and Mobility of Pancreatic Cancer Cells by Up-Regulating GADD45A. *Journal of Cancer*, 13(4), 1229-1240.

Wang, K. K., Yang, Z., Zhu, T., Shi, Y., Rubenstein, R., Tyndall, J. A. ve Manley, G. T. (2018). An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(2), 165-180.

Wang, Z., Liu, T., Gan, L., Wang, T., Yuan, X., Zhang, B. ve Zheng, Q. (2010). Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *European Journal of Pharmacology*, 643(2-3), 211-217.

Warach, S. ve Latour, L.L. (2004). Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. *Stroke*, 35,2659-2661.

Wei, X., Gong, J., Ma, J., Zhang, T., Li, Y., Lan, T. ve Qi, S. (2018). Targeting the Dvl-1/ β -arrestin2/JNK3 interaction disrupts Wnt5a-JNK3 signaling and protects hippocampal CA1 neurons during cerebral ischemia reperfusion. *Neuropharmacology*, 135, 11-21.

Wiesmann, M., Steinmeier, E., Magerkurth, O., Linn, J., Gottmann, D. ve Missler, U. (2010). Outcome prediction in traumatic brain injury: comparison of neurological

status, CT findings, and blood levels of S100B and GFAP. *Acta Neurologica Scandinavica*, 121(3), 178-185.

Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M. ve Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 1-19.

Wu, L., Xiong, X., Wu, X., Ye, Y., Jian, Z., Zhi, Z. ve Gu, L. (2020). Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 28.

Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P. Y., Cheng, Y. L., Cheng, P. W. ve Li, C. J. (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1650-1667.

Wunderlich, M. T., Wallesch, C. W. ve Goertler, M. (2006). Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neurovascular status in acute ischemic stroke. *European journal of Neurology*, 13(10), 1118-1123.

Xie, Q., Li, H., Lu, D., Yuan, J., Ma, R., Li, J. ve Gong, D. (2021). Neuroprotective effect for cerebral ischemia by natural products: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 607412.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J. ve Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96.

Yamato, M., Egashira, T. ve Utsumi, H. (2003). Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1619-1631.

Yang, Y., Zeng, Z., Li, L., Lei, S., Wu, Y., Chen, T. ve Zhang, J. (2023). Sinapine thiocyanate exhibited anti-colorectal cancer effects by inhibiting KRT6A/S100A2 axis. *Cancer Biology and Therapy*, 24(1), 2249170.

Yates, K., Pohl, F., Busch, M., Mozer, A., Watters, L., Shiryaev, A. ve Lin, P. K. T. (2019). Determination of sinapine in rapeseed pomace extract: Its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties. *Food Chemistry*, 276, 768-775.

Yazır, Y. ve Dalçık, H. (2012). Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15(3), 137-142.

Yılmaz, İ. (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 17(2), 143-154.

Yoon, B. H., Jung, J. W., Lee, J. J., Cho, Y. W., Jang, C. G., Jin, C. ve Ryu, J. H. (2007). Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. *Life Sciences*, 81(3), 234-240.

Yumru, M., Savas, H. A., Kalenderoglu, A., Bulut, M., Celik, H. ve Erel, O. (2009). Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(6), 1070-1074.

Zhang, M. ve Shen, Y. (1996). Sinapin01'in antidiareal ve antiinflamatuvar etkileri. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 29–31.

Zhang, M., Liu, Q., Meng, H., Duan, H., Liu, X., Wu, J. ve Yuan, J. (2024). Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 12.

Zhang, Q., Hu, J. X., Kui, X., Liu, C., Zhou, H., Jiang, X. ve Zeng, L. (2017). Sinapic acid derivatives as potential anti-inflammatory agents: synthesis and biological evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(4), 1405.

Zhang, R., Pei, H., Ru, L., Li, H. ve Liu, G. (2013). Bone morphogenetic protein 7 upregulates the expression of nestin and glial fibrillary acidic protein in rats with cerebral ischemia- reperfusion injury. *Biomedical Reports*, 1(6), 895-900.

Zhao, B., Shi, Q. J., Zhang, Z. Z., Wang, S. Y., Wang, X. ve Wang, H. (2018). Protective effects of paeonol on subacute/chronic brain injury during cerebral ischemia in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3836-3846.