

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3',4'-DİHYDROXYFLAVONOLUN SIÇANLARDA BEYİN İSKEMİ-
REPERFÜZYONUNDA SEREBELLUMDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

Gizem Akkaya

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2025

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3',4'-DİHYDROXYFLAVONOLUN SIÇANLARDA BEYİN İSKEMİ-
REPERFÜZYONUNDA SEREBELLUMDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

Gizem Akkaya

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 24202043 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda desteğiyle yanımda olan sabırlı, anlayışlı ve teşvik edici yaklaşımıyla bu süreci kolaylaştıran değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ' a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI' ya, sayın Prof. Dr. Nilsel OKUDAN'a ve sayın Prof. Dr. Muaz BELVİRANLI' ya;

Yüksek lisans eğitimimin tüm aşamalarında her daim sorularıma cevap verip yanımda olan Uzm. Dr. Gözde ACAR; Arş. Gör. Dr. Ebru K. UZDİL; Arş. Gör. Tuğçe ALADAĞ'a ;

Zorluklarla birlikte başa çıktığımız kıymetli arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında sevgilerini ve desteklerini üzerimde hissettiğim, varlıklarıyla yaşamım boyunca bana güç ve huzur veren sevgili annem Berlin AKKAYA ve babam Osman AKKAYA'ya;

Hayatıma her daim neşe ve ilham katan kardeşim Fulya AKKAYA'ya

Tüm içtenliğimle sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. İskemi.....	1
1.2. Beyin İskemisi.....	2
1.3. Beyin İskemisi ve Nöroenflamasyon İlişkisi	4
1.4. Apoptoz	6
1.4.1. Beyin İskemisi ve Apoptoz	6
1.5. Serebellum.....	7
1.5.1. Serebellum ve İskemi Reperfüzyon	8
1.6. Oksidatif Stres	10
1.7. Endoplazmik Retikulum Stresi	12
1.7.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İskemi.....	13
1.7.2. Endoplazmik Retikulum Stresini Tetikleyen Faktörler	15
1.7.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) ve Temel Bileşenleri	16
1.7.4. UPR'nin Apoptoz ile İlişkisi.....	17
1.7.5. PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP Yolu	17
1.7.6. IRE1-XBP1s ve RIDD Mekanizması.....	18
1.7.7. ATF6-Golgi Aktivasyonu ve Transkripsiyonel Düzenleme	19
1.8. C/EBP homolog protein (CHOP).....	20
1.8.1. Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2)	21
1.8.2. HSP70 (Heat Shock Protein 70).....	22
1.8.3. GPR78	24

1.9. Flavonoidler	25
1.9.1. 3',4'-Dihydroxyflavonoid	28
1.9.2. Flavonoidlerin CHOP Üzerine Etkileri	30
1.9.3. Flavonoidlerin HSP70 Üzerine Etkileri	31
1.9.4. Flavonoidlerin GRP78 Üzerinde Etkileri.....	32
1.9.5. Flavonoidlerin Bcl-2 Üzerindeki Etkileri.....	33
1.9.6. Flavonoidlerin Bax Üzerine Etkileri	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Hayvan Grupları.....	38
2.2. Hayvanlar Üzerindeki Prosedürler.....	39
2.3. Real-Time qPCR Analizi.....	39
2.4. İstatistik	42
3. BULGULAR.....	43
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	56
6. KAYNAKLAR.....	57
7. EKLER.....	69
EK-A: Turnitin Raporu	69
EK-B: Etik Kurul Kararı	70
8. ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

AİCA: Anterior İnferior Serebellar Arter

ALCA: Aldehit Dehidrogenaz 1 A

ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

ARE: Antioksidan Yanıt Elementi

ASK1: Apoptoz Sinyali Düzenleyici Kinaz 1

ATF4: Aktivasyon Transkripsiyon Faktörü 4

ATF6: Aktivasyon Transkripsiyon Faktörü 6

BAK: BCL2 Antagonisti/Katili 1

BAX: BCL2-İlişkili X Proteini

BCL2: B Hücreli Lenfoma 2 Proteini

BiP: Bağlantılı İmmünoglobulin Ağır Zincir Bağlayıcı Protein

CAT: Katalaz

CHOP: C/EBP Homolog Protein

CI/RI: Koroner İskemi/Reperfüzyon

Cu: Bakır

DiOHF: 3',4'-Dihidroksiflavonol

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ER: Endoplazmik Retikulum

ERAD: Endoplazmik Retikulum İlişkili Yıkım

Fe: Demir

GABA: Gamma-Aminobütirik Asit

GRP78: Glukoz Düzenleyici Protein 78

GSH: Glutasyon

GSP: Glutasyon S Transferaz

HSP70: Isiya Şok Proteini 70

I/R: Iskemi/Reperfüzyon

ICH: İntraserebral Hemoraji

IL-1B: Interlökin-1 Beta

IL-6: Interlökin-6

IRE1: İnositol Gerektiren Enzim 1

JNK: c-Jun N-terminal Kinaz

LTD: Uzun Süreli Depresyon

LPS: Lipopolisakkarit

MAM: Mitokondriye Bağlı Zar Yapısı

MAPK: Mitojen-İlişkili Protein Kinaz

MCF-7: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

Mg: Magnezyum

MLKL: Karışık Soy Kinaz Alanı Benzeri Protein

MMP: Matris Metalloproteinaz

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

Nec1: Nekrostatin-1 (Programlı nekroz inhibitörü)

NLRP3: NOD Benzeri Reseptör Pirin Alanı İçeren 3

NMDA: N-Metil-D-Aspartat

NO: Nitrik Oksit

NRF2: Nükleer Faktör E2 İlişkili Faktör 2

OGD/R: Oksijen-Glukoz Yoksunluğu/Reperfüzyon

ONOO⁻: Peroksinitrit

PERK: Protein Kinaz R-Benzeri ER Kinaz

PICA: Posterior İnferior Serebellar Arter

P53: Tümör Baskılayıcı Protein 53

RIDD: Düzenlenmiş IRE1 Bağımlı Parçalanma

RIPK1: Reseptör İlişkili Protein Kinaz 1

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SAC: Superior Anterior Serebellar Arter

SAH: Subaraknoid Hemoraji

SCA: Serebellar Ataksi

SOD: Süperoksit Dismutaz

SOD1/2/3: Süperoksit Dismutaz izoenzimleri

TLR: Toll Benzeri Reseptör

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

TXNIP: Tiyoredoksin Etkileşimli Protein

UPR: Katlanmamış Protein Yanıtı (Unfolded Protein Response)

VPR: Viral Protein R

XBP1s: X-Box Bağlantılı Protein 1 (splice formu)

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

3',4'-DİHYDROXYFLAVONOLUN SIÇANLARDA BEYİN İSKEMİ- REPERFÜZYONUNDA SEREBELLUMDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİSİ

Gizem AKKAYA

Fizyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2025

İskemi, dokulara yeterli miktarda kan akışının sağlanamaması sonucu ortaya çıkan ve hücrel enerji üretimini olumsuz etkileyen bir durumdur. Beyin iskemisi ise serebral kan dolaşımının geçici ya da kalıcı olarak kesilmesiyle, nöronal fonksiyonların bozulmasına ve hücre ölümüne neden olan kritik bir patolojik süreçtir. Bu süreçte, endoplazmik retikulum (ER) stresinin tetiklenmesi hücre içi protein katlanma mekanizmalarını bozarak nöronal hasarın artmasına yol açar. Mevcut çalışmada sıçanlarda beyin iskemisi-reperfüzyonu sonrasında 1 hafta süreli 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF) takviyesinin serebellum dokusundaki endoplazmik retikulum stresine olan etkisi incelendi. Çalışma wistar-albino türü erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Toplam 28 adet sıçan kullanılan çalışmada gruplar şu şekilde oluşturuldu. Kontrol grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir anestezi ve cerrahi işlem uygulanmamıştır. Sham grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlarda genel anestezi oluşturulduktan sonra karotid arter bölgeleri açılıp kapatılmıştır. Uygulama sonrası 1 hafta süreli çözücü uygulaması yapılmıştır (1 ml DiOHF çözücüsü). İskemi-Reperfüzyon grubu (n=8): Genel anestezi altında sıçanlarda karotid arterler izole edildikten sonra 30 dakika süreyle ligate edilerek iskemisi yapılmıştır, takibinde reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. İskemi-Reperfüzyon + DiOHF Grubu (n=8): Genel anestezi altında sıçanlarda karotid arterler 30 dakika ligasyonla iskemisi yapıldıktan sonra reperfüzyona izin verilmiştir. 1 hafta süre ile DiOHF takviyesi yapılmıştır.

Bir haftalık tedavi sonrası genel anestezi altında hayvanlar öldürülerek serebellum dokuları alınarak GRP78, HSP70, CHOP, Bcl-2 ve Bax seviyeleri değerlendirildi. İ/R serebellumda GRP78, HSP70, CHOP ve Bax değerlerini artırırken, Bcl-2 seviyelerinde önemli baskılanmaya yol açtı. Ancak, 1 hafta boyunca 3',4'-Dihydroxyflavonol uygulaması İ/R ile oluşan bozulmaları düzeltti.

Çalışma sonuçları İ/R sonrası 1 hafta süreli 3',4'-Dihydroxyflavonol tedavisinin fokal beyin İ/R'nin serebellumda oluşturduğu endoplazmik retikulum stresine ilgili parametrelerde önemli düzeltme sağladığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: İskemi/Reperfüzyon; 3',4'-Dihydroxyflavonol; GRP78, HSP70, CHOP, Bcl-2, Bax ve sıçan

SUMMARY

REPUBLIC OF TÜRKİYE
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTHY SCIENCES INSTITUTE

THE EFFECT OF 3',4'-DIHYDROXYFLAVONOL ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN THE CEREBELLUM DURING BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

Gizem AKKAYA

Department of Physiology

MASTER THESIS / KONYA-2025

Ischemia is a condition that occurs as a result of insufficient blood flow to the tissues and negatively affects cellular energy production. Brain ischemia is a critical pathological process that causes neuronal function to deteriorate and cell death due to temporary or permanent interruption of cerebral blood circulation. During this process, triggering endoplasmic reticulum (ER) stress disrupts intracellular protein folding mechanisms, leading to increased neuronal damage. In the current study, the effect of 1-week 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF) supplementation on endoplasmic reticulum stress in cerebellum tissue after cerebral ischemia-reperfusion in rats was investigated. The study was conducted on male Wistar-albino rats. A total of 28 rats were used in the study and the groups were formed as follows. Control group (n=6): No anesthesia or surgical procedure was applied to the animals in this group. Sham group (n=6): After general anesthesia was induced in the animals in this group, the carotid artery regions were opened and closed. After the application, solvent application was performed for 1 week (1 ml DiOHF solvent). IschemiaReperfusion Group (n=8): After isolating the carotid arteries in rats under general anesthesia, ischemia was performed by ligating them for 30 minutes, followed by reperfusion. IschemiaReperfusion + DiOHF Group (n=8): After ischemia was performed by ligating the carotid arteries in rats under general anesthesia for 30 minutes, reperfusion was allowed. DiOHF supplementation was performed for 1 week. After one week of treatment, animals were killed under general anesthesia and cerebellum tissues were taken to evaluate GRP78, HSP70, CHOP, Bcl-2 and Bax levels. While I/R increased GRP78, HSP70, CHOP and Bax values in the cerebellum, it caused significant suppression in Bcl-2 levels. However, 3',4'-Dihydroxyflavonol application for 1 week corrected the deteriorations caused by I/R.

The study results show that 1 week of 3',4'-Dihydroxyflavonol treatment after I/R provides significant correction in endoplasmic reticulum stress related parameters caused by focal brain I/R in the cerebellum.

Keywords: Ischemia/Reperfusion; 3',4'-Dihydroxyflavonol; GRP78, HSP70, CHOP, Bcl-2, Bax and rat

1. GİRİŞ

1.1. İskemi

İnme, beyin, omurilik veya retina dokusunda, vasküler bir nedene bağlı olarak gelişen hücre ölümüyle karakterize edilen, klinik belirtilerle birlikte veya yalnızca görüntüleme bulgularıyla saptanabilen, acil müdahale gerektiren bir nörolojik durumdur (Sacco ve ark 2013).

İnme, dünya genelinde ölümün ikinci önde gelen nedeni ve uzun süreli sakatlıkların başlıca sebeplerinden biridir(Feigin ve ark 2021). Özellikle yaşlanan nüfusla birlikte inme görülme sıklığı artmakta; düşük ve orta gelirli ülkelerde, inme kaynaklı ölüm ve sakatlık oranları yüksek seyretmektedir. Ayrıca, iskemik inme olguları tüm inme vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturarak, patofizyolojik olarak en yaygın inme türü olarak öne çıkmaktadır (Campbell ve Khatri 2020). İnme, altta yatan patofizyolojik mekanizmaya göre temelde iki ana gruba ayrılmaktadır: iskemik ve hemorajik inme. En yaygın form olan iskemik inme, serebral arterlerin bir trombus ya da emboli nedeniyle tıkanması sonucunda beyin dokusuna kan akışının kesilmesiyle meydana gelir. Bu inme tipi, tüm inme vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur ve özellikle yaşlı popülasyonda daha sık görülür (Meschia ve ark 2014). Etiyolojik sınıflandırma açısından yaygın olarak kabul gören TOAST sistemine göre iskemik inmeler beş alt gruba ayrılır: büyük damar hastalıkları (ateroskleroz), kardiyoembolik kaynaklı inmeler, laküner infarktlar (küçük damar hastalığı), spesifik diğer nedenlere bağlı inmeler ve nedeni tam olarak belirlenemeyen olgular (Adams ve ark 1993). Bu sınıflandırma, hem klinik değerlendirmelerde hem de tedavi stratejilerinin belirlenmesinde temel bir referans niteliği taşır.

Diğer yandan, hemorajik inme, beyin damarlarının yırtılması sonucu kanın beyin dokusuna veya beyin zarı altına sızmasıyla oluşur. Tüm inme vakalarının %10 ila %15'ini oluşturan bu tip, genellikle ani başlangıçlı ve daha ağır seyirli klinik tablolarla ilişkilidir (Yew ve Cheng 2009). Hemorajik inmeler iki temel alt tipe ayrılır: intraserebral hemoraji (ICH) ve subaraknoid hemoraji (SAH). İntraserebral hemorajide kanama doğrudan beyin parankimi içine gerçekleşirken, subaraknoid hemorajide kan,

beyin yüzeyi ile leptomeninksler arasındaki subaraknoid aralığa yayılır. Her iki durumda da intrakranial basınç artışı ve yaygın nöronal hasar kaçınılmazdır.

İnme gelişiminde etkili olan başlıca risk faktörleri arasında hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, sigara kullanımı, atriyal fibrilasyon, obezite ve sedanter yaşam tarzı yer alır. Bununla birlikte, yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık da önemli belirleyiciler arasındadır (Pedelty ve Gorelick 2013).

1.2. Beyin İskemisi

Beyin, vücut ağırlığının yalnızca yaklaşık %2'sini oluşturmasına rağmen, toplam oksijen tüketiminin %20'sinden fazlasını gerçekleştirir; bu yüksek metabolik aktivite, beyni oksijen ve glukoz yetersizliklerine karşı son derece duyarlı hâle getirir (Clarke 1999). Feigin ve arkadaşlarının bildirdiğine göre, 1990'dan 2013'e kadar yaşa göre düzeltilmiş inme insidansı ve mortalite oranlarında genel bir azalma gözlemlenmiş olsa da, inmeden etkilenen ve inme nedeniyle engelli kalan bireylerin sayısı dünya genelinde artış göstermiştir (Krishnamurthi ve Feigin 2022).

Beynin belirli bölgelerine yetersiz kan ve oksijen ulaşması, iskemik hasarın temelini oluşturan kritik bir durumdur. Bu süreç, hücrelerin enerji metabolizmasını bozarak kısa süre içerisinde kalıcı hücrel hasar ve hücre ölümüne neden olabilir (Kalogeris ve ark 2012). Beyin iskemisinin temel nedenleri arasında tromboz, emboli ve sistemik hipoperfüzyon bulunur. Tromboz, genellikle aterosklerotik plaklar üzerinde oluşan pıhtıların damarları tıkanmasıyla ortaya çıkarken (Campbell ve Khatri 2020), emboli vücudun başka bölgelerinde oluşan pıhtıların koparak beyin damarlarını tıkanmasıyla gerçekleşir (Hankey 2017). Hipoperfüzyon ise kalp yetmezliği ya da ciddi hipotansiyon durumlarında beyne yeterince kan akımı sağlanamamasıyla ilişkilidir (Powers ve ark 2018).

Klinik olarak, beyin iskemisi geçici iskemik atak (TIA) ve iskemik inme olarak iki temel gruba ayrılır. Geçici iskemik ataklar (TIA), çoğunlukla 24 saat içinde gerileyen geçici nörolojik bulgularla seyretse de, ileride gelişebilecek inme açısından ciddi bir uyarı niteliği taşır (Easton ve ark 2009). Uzun süren kan akımı kesintileriyle

oluşan iskemik inme, kalıcı beyin dokusu kaybı ve ağır nörolojik sekellere neden olur ve inmelerin yaklaşık %80-85'ini oluşturur (Meschia ve ark 2014).

Beyin iskemisi sonucu gelişen temel patofizyolojik süreçler, nöronal hasar, oksidatif stres, inflamasyon, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve mitokondriyal disfonksiyon ile eksitotoksisite olarak sıralanabilir. Hücresel düzeyde enerji metabolizmasının bozulmasıyla ATP üretiminin azalması, hücre ölümünün temel mekanizmalarındandır (Lipton 1999). Ayrıca, iskemi sonrası reperfüzyon sırasında oluşan aşırı miktarda reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif stres ve inflamasyonu artırarak hücresel hasarı derinleştirir (Chamorro ve ark 2016). Endoplazmik retikulumda biriken yanlış katlanmış proteinlerin tetiklediği ER stresi ve mitokondriyal fonksiyonların bozulması apoptotik süreçleri aktive eder ve hücre ölümüne katkıda bulunur (Nakka ve ark 2010). Aynı zamanda enerji yetmezliği sonucu glutamat gibi eksitatör nörotransmitterlerin aşırı salınımı, nöronal hücrelerde toksik kalsiyum girişini tetikleyerek eksitotoksisite yoluyla hücre ölümüne neden olur (Lai ve ark 2014).

Moleküler düzeyde ise eksitotoksisite, oksidatif stres, ER stresi ve inflamasyon gibi süreçler karmaşık mekanizmalarla birbirini etkiler. Eksitotoksisite sırasında glutamatın aşırı salınımı, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına ve hücre içine aşırı kalsiyum girişiyle nöronal hasarın şiddetlenmesine yol açar (Dirnagl ve ark 1999). Bu mekanizmaya paralel olarak reperfüzyon sırasında ortaya çıkan aşırı ROS üretimi de lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna neden olarak nöronal hasarı pekiştirir (Wu ve ark 2020). Ayrıca, ER stresinin kronikleşmesiyle unfolded protein response (UPR) tetiklenir; CHOP ve GRP78 benzeri stres belirteçleri artar, bu durum da apoptotik sinyal yollarını aktive ederek hücre ölümünü kolay bir hale getirir (Hetz ve Saxena 2017). Bunlarla birlikte, inflamasyon ve mikroglial aktivasyon da iskemi sonrası sekonder hasarı artıran önemli faktörlerdir (Jayaraj ve ark 2019).

Beyin iskemisine yönelik tedaviler, akut dönem tedavileri ve kronik dönem rehabilitasyonu olarak iki ana kategoride incelenir. Akut dönemde, ilk saatler içerisinde uygulanan trombolitik tedaviler (örn. tPA uygulaması) ile kan akışının yeniden

sağlanması, kalıcı hasarı azaltmak adına kritik öneme sahiptir (Powers ve ark 2018). Mekanik trombektomi, büyük damarların tıkanıklıklarında fiziksel müdahale ile pıhtının çıkarılmasını sağlayarak iskemik hasarı sınırlamada oldukça etkilidir (Saver ve ark 2015). Kronik dönemde ise fizyoterapi, konuşma terapisi gibi rehabilitasyon yöntemleri ile fonksiyonel iyileşme hedeflenir (Langhorne ve ark. 2011). Bununla birlikte hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemi gibi risk faktörlerinin kontrol edilmesi, medikal tedavi ve yaşam tarzı düzenlemeleri ile sekonder inme riskinin azaltılması açısından önem taşımaktadır (Hankey 2017).

1.3. Beyin İskemisi ve Nöroenflamasyon İlişkisi

Beynin bazı bölgelerine oksijen ve glukoz akışının yetersiz kalması, iskemik hasara neden olan ciddi bir durumdur (Kalogeris ve ark 2012). İskemi esnasında ortaya çıkan hücresel hasar, sadece kan akımının durmasıyla değil, aynı zamanda reperfüzyon döneminde tetiklenen sekonder hasar mekanizmaları ile de yakından ilişkilidir (Chamorro ve ark 2016). Nöroinflamasyon, ikincil iskemik hasarın genişlemesine önemli ölçüde katkı sağlayan başlıca süreçlerden biridir (Anrather ve Iadecola 2016). Serebral iskemi, oksijen ve enerji arzının kesintiye uğramasıyla birlikte metabolik homeostazın bozulmasına neden olmakta; bu durum nöroinflamatuvar yanıtların tetiklenmesine ve akabinde hücresel düzeyde yapısal ve işlevsel hasarın ilerlemesine yol açmaktadır (Lei ve ark 2025). Serebral iskemiyi takiben vasküler yapılarda hızlı bir inflamatuvar yanıt gelişmekte; bu süreç, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna aracılık eden proinflamatuvar mediyatörlerin salınımıyla karakterizedir ve nöronal hasarın derinleşmesine katkıda bulunmaktadır. Reperfüzyon evresinde hücre içi demirin aşırı birikimi, Fenton reaksiyonunu tetikleyerek reaktif oksijen türlerinin artışına yol açmakta ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Bu süreç, hücre membran bütünlüğünü bozarak ferroptotik hücre ölümünü indüklemektedir. Güncel literatür, inflamasyon ile ferroptoz arasındaki etkileşimin, serebral iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarının moleküler mekanizmaları içerisinde giderek daha kritik bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır (He ve ark 2024).

Beyin iskemisi sonrası gelişen nöroinflamatuvar yanıt, mikroglial hücrelerin aktive olması, astrositlerin reaktif hale gelmesi, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve periferel inflamatuvar hücrelerin beyin dokusuna göçü ile karakterizedir (Jayaraj ve ark 2019). İskeminin erken fazında, enerji eksikliği ve iyon dengesizliği gibi stres faktörleri nöron ve endotelyal hücreleri doğrudan etkiler; bu durum, inflamatuvar yanıtı başlatan moleküler sinyallerin salınımına yol açar (Iadecola ve Anrather 2011). Merkezi sinir sisteminin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar, iskemi sonrasında hızla aktifleşir; lezyon bölgesine göç ederek TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar mediatörleri salgılamak suretiyle inflamatuvar süreci başlatırlar (Jin ve ark 2010). Akut dönemde mikroglial hücrelerin aktive olması, nekrotik hücre artıklarının temizlenmesi ve doku onarımının desteklenmesi açısından faydalı olabilirken, bu aktivasyonun uzaması veya kontrolsüz hale gelmesi durumunda, salınan sitokinler yoluyla inflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine ve sekonder doku hasarının artmasına neden olabilir (Hu ve ark 2015). İskemik hasar sonrasında astrositler reaktif fenotipe geçerek proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini artırır. Aynı zamanda glial skar oluşumunu teşvik ederek sinir dokusundaki inflamatuvar sürecin uzamasına ve kronik nöroinflamasyona zemin hazırlarlar (Sofroniew 2014). Astrosit-mikroglia arası hücrelerel iletişim, iskemik inflamasyonun zamansal ve şiddetsel özelliklerini belirleyen temel mekanizmalardan biridir ve bu etkileşimlerin bozulması inflamatuvar yanıtın patolojik seyrini ağırlaştırabilir (Liu ve Chopp 2016). Sonuç olarak, iskemik beyin hasarı ve nöroinflamasyon arasında karşılıklı etkileşime dayalı dinamik bir ilişki bulunmaktadır. İskemik olaylar inflamatuvar süreci başlatırken, inflamasyonun uzaması sekonder nöronal hasarı derinleştirerek iyileşme potansiyelini azaltır. Bu nedenle, nöroinflamatuvar yanıtın modülasyonuna yönelik tedavi stratejileri, iskemik inmeye bağlı beyin hasarının azaltılmasında umut vadeden yaklaşımlar arasında değerlendirilmektedir (Anrather ve Iadecola 2016). Reperfüzyonun ardından bozulan mitokondriyal yapıların ortadan kaldırılmasında görev alan otofaji ve mitofaji süreçleri başlangıçta koruyucu bir yanıt oluşturur. Ancak bu mekanizmaların aşırı aktivasyonu, hücreyi onarımdan ziyade ölüm sinyallerinin hâkim olduğu bir ortama sürükleyebilir (Anrather ve Iadecola 2016). Reperfüzyon sonrası yükselen NO üretimi, süperoksit ile birleşerek peroksinitrit meydana getirir; bu reaktif tür, özellikle nükleik

asitler, hücre membranları ve enzim sistemleri üzerinde yıkıcı etkilere sahip olup iskemik hasarın ilerlemesine katkıda bulunur (Endres ve ark 1998).

1.4. Apoptoz

Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmadan ve çevre dokulara zarar vermeksizin hücrelerin düzenli biçimde ortadan kaldırıldığı kontrollü bir ölüm sürecidir (Kerr ve ark 1972). Hücrelerin yaşamsal işlevleri ve ölümü, programlanmış hücre ölümü mekanizması olan apoptozis ile sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Apoptozis, embriyonik gelişim süreçlerinin ilerlemesini sağlamak ve doku homeostazi ile bağışıklık sisteminin düzgün işleyişini korumak açısından kritik bir rol oynamaktadır (Mustafa ve ark 2024). Embriyonik gelişimden itibaren apoptoz, fazla ya da hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev alarak organizmanın fizyolojik düzeninde kilit bir rol oynar (Elmore 2007).

Ekstrinsik apoptoz yolu, Fas ve TNF reseptörlerinin ligandlarıyla etkileşime girerek hücre içi ölüm sinyallerinin başlatılmasıyla aktive olur. Bu etkileşim, adaptör proteinler aracılığıyla kaspaz-8'in aktif hale gelmesini sağlar (Ashkenazi ve Dixit 1998).

İntrinsik apoptoz yolu, mitokondri dışı membranının geçirgenliğinde meydana gelen artışla başlar. Bu değişim, sitokrom c'nin sitozole salınmasına yol açar ve ardından apoptozum kompleksi üzerinden kaspaz-9'un aktivasyonu gerçekleşir (Green ve Kroemer 2004). Her iki apoptoz yolu da kaspaz-3 gibi efektör moleküllerin aktive olduğu ortak yürütücü fazda birleşir ve bu durum hücrenin kontrollü ölümüne yol açar (Fuchs ve Steller 2011). B hücreli lenfoma 2 (BCL2) protein ailesi, mitokondri aracılığıyla sitokrom c salınımını düzenleyerek apoptoz sürecinin önemli bir kontrol noktasıdır (Vogler ve ark 2025)

1.4.1. Beyin İskemisi ve Apoptoz

İskemik beyin hasarında apoptoz, özellikle reperfüzyon fazında daha yoğun şekilde görülmektedir. Bu süreçte gelişen oksijen ve glukoz eksikliği, hücresel enerji düzeylerini düşürerek mitokondriyi hedef alır ve içsel apoptotik sinyallerin devreye

girmesine neden olur (Broughton ve ark 2009). ATP seviyelerindeki düşüş, mitokondri dış membranının geçirgenliğini artırarak hücre ölümünü tetikleyen Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlerin etkinliğini artırırken, hayatta kalımı destekleyen Bcl-2 gibi proteinlerin işlevini baskılar (Youle ve Strasser 2008). Mitokondri dış zarının geçirgen hale gelmesiyle sitokrom c sitoplazmaya salınır; bu da apoptosomun oluşumuna ve kaspaz kaskadının aktive olmasına yol açar (Galluzzi ve ark 2012).

Reperfüzyon evresinde gelişen oksidatif stres, inflamatuvar yanıtlar ve endoplazmik retikulum stresi, hücre ölümünü tetikleyen başlıca unsurlar arasındadır. Uzamış ER stresi, UPR mekanizmalarını aşırı aktive ederek CHOP gibi apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu artırır (Hetz ve Saxena 2017).

İskemik beyin hasarında, hücre ölümünün baskın biçimde apoptoz yoluyla gerçekleştiği bölge genellikle 'penumbra' olarak tanımlanan doku alanıdır. Bu nedenle, bu bölgedeki apoptotik süreçlerin hedeflenmesi, iskemik hasarın sınırlandırılması açısından klinik olarak büyük önem taşır (Broughton ve ark 2009).

Sonuç olarak, beyin iskemisi sonrası apoptozun tetiklenmesi, iskemik hasarın boyutunu belirleyen ve terapötik müdahaleler için önemli hedefler sağlayan kritik bir mekanizmadır. Bu nedenle, apoptotik süreçlerin moleküler mekanizmalarının detaylı bir şekilde anlaşılması, iskemik beyin hasarına yönelik etkili nöroprotektif tedavilerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır.

1.5. Serebellum

Serebellum, arka fossa içinde yer alan ve postüral duruş, denge ile motor koor dinasyonun düzenlenmesinde temel rol oynayan bir beyin bölgesidir (Ito,2006).

Serebellum, toplam beyin hacminin küçük bir bölümünü oluştursa da, nöronların büyük kısmını barındırması nedeniyle yüksek işlem kapasitesine sahiptir (HerculanoHouzel 2012).

Serebellum; orta hatta yer alan vermis, her iki yanda bulunan serebellar hemisferler ve bu yapıların üzerinde yer alan üç katmanlı korteks ile birlikte, korteksin altında bulunan derin serebellar çekirdeklerden meydana gelir (Kandel 2013).

Serebellar korteks, sırasıyla dıştan içe moleküler, Purkinje ve granül hücre tabakaları olarak üç katmandan meydana gelir. Serebellumda GABAerjik inhibitör görev üstlenen Purkinje hücreleri, korteksin derin çekirdeklere uzanan tek çıkış yolunu oluşturur ve motor işlevlerin hassas kontrolünü sağlar (Voogd ve Glickstein 1998).

Serebellum sadece motor işlevlerle sınırlı kalmaz; güncel araştırmalar, bilişsel süreçler, öğrenme, dikkat ve duygusal düzenleme gibi görevlerde de yer aldığını göstermektedir (Schmahmann 2019). Bu nedenle, serebellum hasarları yalnızca hareket bozuklukları ile değil, aynı zamanda yürütücü işlev eksiklikleri ve davranışsal değişikliklerle de sonuçlanabilir. Serebellumun vasküler beslenmesi SCA, AICA ve PICA arterleri tarafından sağlanmakla birlikte, bu arterlerin sulama bölgeleri arasında kalan sınır alanlar (watershed bölgeler) iskemi açısından daha duyarlı hale gelebilir (Kase ve ark 1993). Yeni literatür, serebellumun motor kontrol dışında bilişsel ve duygusal süreçlerde de rol oynadığını vurgulamaktadır (Schmahmann 2019).

1.5.1. Serebellum ve İskemi Reperfüzyon

Serebellumda meydana gelen hasarlar, oküler dismetri, dizatri ve ataksi gibi semptomlara neden olarak motor koordinasyonu ciddi şekilde bozabilir (Manto ve ark 2012). Reperfüzyon sürecinde ortaya çıkan redoks dengesizliği ve artan oksidatif stres, mitokondriyal geçirgenlik bozuklukları ve kalsiyum yüklenmesi yoluyla mitokondriyal disfonksiyon, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz gibi hücrel hasar mekanizmalarını tetikleyebilir (Zorov ve ark 2014).

Serebellumda, özellikle yüksek metabolik aktiviteye ve yoğun kalsiyum yüklenmesine sahip Serebellumun temel çıkış nöronları olan Purkinje hücreleri, metabolik olarak oldukça aktif olmaları nedeniyle iskemik hasara karşı duyarlıdır (Welsh ve ark 2002). Bu hücreler, iskemi sonrası erken dönemde GABA_A reseptör fonksiyonlarını kaybeder ve bu durum inhibitör sinyalleşmenin azalmasına ve eksitotoksositeye karşı duyarlılığın artmasına neden olur. Allopregnanolon gibi nöroprotektif ajanların, GABA_A reseptör stabilizasyonu yoluyla Purkinje hücrelerini koruyabildiği gösterilmiştir (Kelley ve ark 2008). İskemik olaylardan sonra, serebellar

Purkinje hücrelerinin sinaptik plastisite kapasitesi azalmış ve uzun süreli depresyon (LTD) gibi mekanizmaların kalıcı şekilde sekteye uğradığı bildirilmiştir (Quillinan ve ark 2017). Ayrıca, iskemi sonrası Purkinje hücrelerinde uzun süreli depresyon (LTD) gibi sinaptik plastisite mekanizmalarında kalıcı bozulmalar gözlenmiştir (Quillinan ve ark 2017).

Beyindeki en yoğun nöronal bölge olan serebellum, yalnızca motor kontrol değil aynı zamanda duygusal işlevler gibi pek çok süreçte görev almaktadır (Ito 2006). Çalışmalar, serebellumun motor kontrolün ötesinde dikkat, dil ve duygusal işlevlerde de kilit rol oynadığını göstermiştir (Schmahmann ve Sherman 1998).

Serebellumda oluşan lezyonlar, özellikle yürüme ve konuşma koordinasyonunda belirgin bozulmalarla kendini gösterebilen ataksi, dizartri ve göz hareketlerindeki sapmalar (oküler dismetri) gibi çeşitli motor disfonksiyonlara yol açarak motor sistemde ciddi aksamalara neden olabilir (Manto ve ark 2012).

Reperfüzyon sonrası oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), hücre içi kalsiyum dengesizliği ve oksidatif stresin artmasına neden olarak mitokondriyal disfonksiyon, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz gibi hücre hasar süreçlerini tetikler (Circo ve Aw 2010).

Serebellumda, özellikle yüksek metabolik aktiviteye ve yoğun kalsiyum yüklenmesine sahip Purkinje hücreleri, kalsiyum sinyalleşmesindeki değişikliklere karşı daha hassastır (Llano ve ark 1994). İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında oluşan oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna neden olarak 4-hidroksi-nonenal (4-HNE) gibi toksik aldehytlerin birikmesine yol açmakta ve bu da hücresel düzeyde ek hasar mekanizmalarını tetikleyebilmektedir (Liu ve ark 2022). Yüksek metabolik talepleri ve kalsiyum yüklenmesine duyarlılıkları nedeniyle Purkinje hücreleri, iskemik koşullarda gelişen oksidatif strese karşı oldukça hassastır ve bu durum onları apoptoza yatkın hâle getirir (Kitao ve ark 2004). Reperfüzyon sürecinde artan nitrik oksit (NO) düzeyleri, süperoksit ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumuna yol açar; bu reaktif tür DNA, protein ve lipidlerde oksidatif hasara neden olarak nöronal hücre ölümünü hızlandırır (Pacher ve ark 2007).

1.6. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücre içindeki oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan ve hücresel hasara yol açabilen bir durumdur (Sies 2020). Normal koşullarda ROS'lar, hücresel sinyal iletimi ve bağışıklık savunması gibi fizyolojik süreçlerde rol oynar. Ancak aşırı üretildiklerinde ya da antioksidan kapasite yetersiz kaldığında; lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllere zarar vererek hücre fonksiyonlarını bozar (Betteridge 2000). Bu süreçler özellikle nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve iskemik reperfüzyon hasarları gibi çok sayıda patolojide önemli rol oynar.

İskemi süresince dokulara oksijen ve besin akışı kesildiğinde, mitokondriyal solunum durur ve hücreler anaerobik metabolizmaya yönelir. Bu sırada hücre içi ATP düzeyi azalır, iyon pompaları bozulur ve hücresel homeostaz zarar görür (Kalogeris ve ark 2014). Reperfüzyonla birlikte oksijen yeniden dokulara ulaştığında, mitokondrilerden ve enzimatik kaynaklardan yüksek miktarda reaktif oksijen türü (ROS) üretilir. Bu hızlı ROS artışı literatürde 'oksidatif patlama' (oxidative burst) olarak tanımlanır (Eltzschig ve Eckle 2011). Reperfüzyon sırasında oluşan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidrosil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS); lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi mekanizmalarla hücresel bütünlüğü bozarak iskemik hasarın derinleşmesine katkıda bulunur (Pham-Huy ve ark 2008). Hücreler bu dengesizliği kontrol altına almak için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik savunma sistemlerini ve glutatyon (GSH), vitamin C, E vitamini gibi non-enzimatik antioksidanları devreye sokar (Birben ve ark 2012). Oksidatif stresin aşırı düzeylere ulaşması durumunda, hücresel savunma mekanizmaları yetersiz kalabilir ve bu da apoptoz, nekroz ve ferroptoz gibi programlanmış hücre ölüm yollarının aktive olmasına yol açar (Dixon ve ark 2012). Demir birikimi ve artan lipid peroksidasyonu ile karakterize edilen ferroptoz, özgün bir programlı hücre ölüm yoludur. Serebral iskemi-reperfüzyon (CI/RI) sürecinde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ve antioksidan savunma sistemlerinin zayıflaması sonucu ferroptoz mekanizması aktive olur. Bu süreçte, demir taşıyıcı proteinlerin (örneğin DMT1) ekspresyonunun artması hücre içi

demir yükünü artırır ve bu durum ROS üretimini tetikler (Yan ve ark 2021). Aynı zamanda, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması, lipid peroksidlerin detoksifikasyonunu engeller ve hücre zarında oksidatif hasara yol açar (Zhou ve ark 2024). Bu mekanizmalar, hücresel bütünlüğü bozarak nöronal ölümle sonuçlanan ferroptotik sürecin ilerlemesine neden olur (Dixon ve ark 2012). Ferroptozun, apoptoz ve nekroptoz gibi diğer hücre ölüm biçimleriyle etkileşimde bulunduğu ve otofajiyle kesişen sinyal yollarına sahip olduğu rapor edilmiştir (Xie ve ark 2016).

Bu nedenle, ferroptozu hedef alan terapötik stratejiler — örneğin demir şelatörleri veya liproksstatin-1 CI/RI kaynaklı nöronal hasarın azaltılmasında umut verici adaylar olarak değerlendirilmektedir (Xie ve ark 2016). Nekroptoz, kaspaz-8 bağımlı apoptozun bloke olduğu durumlarda alternatif olarak aktive edilen, programlanmış bir hücre ölüm şeklidir. Hücre dışı ölüm sinyalleri özellikle TNF- α , FasL ve TLR (Toll-benzeri reseptör) ligandları tarafından tetiklenen bu yol, RIPK1 ve RIPK3'ün karşılıklı fosforilasyonu ile başlar ve ardından MLKL'nin aktivasyonu ile sonlanır. Fosforile MLKL, hücre zarına transloke olur ve por oluşturucu özellik kazanarak membran bütünlüğünü bozar; bu durum hücre içeriğinin dışarı sızmasına neden olur ve inflamatuvar bir mikroçevre oluşmasına yol açar (Pasparakis ve Vandenabeele 2015).

Serebral iskemi-reperfüzyon (CI/RI) sürecinde, özellikle reperfüzyonun ilk saatlerinde oksidatif stres ve inflamasyonla eş zamanlı olarak nekroptotik yol aktif hale gelir (Zhang ve ark 2017). Çalışmalar, RIPK1 inhibitörü Necrostatin-1 (Nec-1) tedavisinin fare modellerinde infarct hacmini azalttığını, ödemi sınırladığını ve nörolojik iyileşmeyi desteklediğini göstermektedir (Degterev ve ark 2005). Bununla birlikte, RIPK3 geninin silinmesi ya da MLKL fonksiyonunun farmakolojik inhibisyonu da benzer koruyucu etkiler yaratmıştır. Bu veriler, nekroptozun CI/RI patofizyolojisinde yalnızca bir hücre ölüm yolu değil, aynı zamanda inflamasyonu tetikleyerek hasarın yayılmasında rol oynayan pro-inflamatuvar bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır (Lau ve ark 2013). Nekroptoz, sadece nöronal hücreleri değil, glial hücreleri de etkileyerek nöron-glia etkileşimini bozar ve mikroglia aktivasyonunu

artırır. Bu süreç, bölgesel inflamasyonun sürmesine ve ikincil doku hasarının yayılmasına katkı sağlar (Tao ve ark 2022). Bu bağlamda, nekroptozu hedefleyen çok yönlü tedavi stratejileri örneğin RIPK1 inhibitörleri, MLKL blokerleri ve inflamasyon modülatörleri serebral iskemiye bağlı nörodejenerasyonu önlemede önemli bir potansiyel taşımaktadır (Deng ve ark 2019).

İ/R hasarında rol oynayan temel mekanizmalardan biri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine bağlı gelişen oksidatif strestir. Bu süreç, hücre zarında lipidlerin oksidatif yıkımı, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve inflamatuvar yanıtların tetiklenmesiyle yakından ilişkilidir (Xiang ve ark 2021). Mitokondriler hem hücreSEL enerji üretiminin merkezi hem de ROS üretiminin temel kaynağıdır. İşlev bozukluğu durumunda hem enerji üretimi azalır hem de ROS birikimi artar; bu durum hücreyi programlı ölüm (apoptoz) ya da hücreSEL yıkım (nekroz) yollarına yönlendirebilir (Angelova ve Abramov 2016). Demir birikimiyle ilişkili olarak lipid peroksidasyonunun artması, ferroptozun apoptozdan farklı bir ölüm yolu olarak tanımlanmasına neden olmuştur. Bu ölüm biçiminde, kaspazlar değil; reaktif oksijen türlerinin (ROS) lipid bileşenleri üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar belirleyicidir. Hücre içi antioksidan savunmanın zayıflaması, özellikle glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) enzim aktivitesinin düşmesi ya da sistin eksikliği durumlarında ferroptoz süreci tetiklenmektedir. Sonuç olarak, demir-katalizli lipid ROS birikimi hücre zarında geri dönüşü olmayan yıkımlara neden olur (Stockwell ve ark 2017, Dixon ve ark 2012). İskemik inme esnasında, aşırı glutamat salınımına bağlı gelişen eksitotoksisite nöronal hasarı tetiklerken; aynı zamanda GABAerjik inhibisyonun azalması, bu hasarın şiddetini artırarak hücreSEL dengenin bozulmasına sebep olur (Doyle ve ark 2008).

1.7. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryotik hücrelerde ribozomlarla ilişkili granüllü (rough) ve ribozomsuz düz (smooth) olmak üzere iki yapısal formda bulunan membranöz bir organeldir. Granüllü ER, yüzeyinde ribozomlar taşınması nedeniyle protein sentezi, katlanması, post-translasyonel modifikasyonlar ve kalite kontrol

süreçlerinde etkin rol oynar. Buna karşın, ribozomsuz yapısıyla düz ER; lipid ve steroid sentezi, detoksifikasyon gibi çeşitli metabolik faaliyetlerde görev alır (Berridge 2002).

Endoplazmik retikulum (ER), protein katlanması, kalsiyum homeostazı ve lipid biyosentezi gibi temel hücresel işlevlerin düzenlenmesinde kritik rol oynar. İskemik-reperfüzyon sırasında bu işlevlerin bozulması, ER stresine yol açarak hücresel hasarı tetikler (Hotamisligil 2010). Son yıllarda yapılan araştırmalar, endoplazmik retikulum stresinin yalnızca hücre içi homeostazı düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik bozuklukların patogeneğinde de merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Hetz ve Saxena 2017).

Özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi metabolik bozukluklarla ilişkilendirilen kronik ER stresi, hücresel fonksiyonları olumsuz etkileyerek doku düzeyinde hasarın gelişimine katkıda bulunmaktadır (Wang ve Kaufman 2016).

1.7.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İskemi

Son yıllarda endoplazmik retikulum (ER) stresi, insan hastalıklarında önemli bir düzenleyici faktör olarak öne çıkmış ve ERAD, oksidatif stres (OS), mitokondriyal işlev bozukluğu, otofaji ile metabolizma üzerinde etkili olabileceği geniş çapta ele alınmıştır (Chen ve ark 2023). Bu nedenle, ER stres yanıtlarının moleküler düzeyde detaylı anlaşılması, hedefe yönelik yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde büyük potansiyel taşımaktadır (Oakes ve Papa 2015).

Endoplazmik retikulum (ER), yalnızca protein katlanmasında değil, aynı zamanda hatalı veya yanlış katlanmış proteinlerin tanınarak ortadan kaldırılmasında da önemli bir rol üstlenir. Bu süreç, ER ilişkili yıkım (ERAD) mekanizması aracılığıyla yürütülür. ERAD, anormal yapıdaki proteinleri tanıyarak onları sitozole taşır ve burada ubiquitin-proteazom sistemi üzerinden yıkımlarını sağlar. Bu mekanizma, hücresel homeostazın korunması ve toksik protein birikiminin önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Smith ve ark 2011). Hipoksi, hücrelerin metabolik gereksinimlerini karşılayacak düzeyde oksijen alamaması sonucu gelişen, hücresel düzeyde ciddi adaptif yanıtları tetikleyen bir durumdur. Normal oksijen seviyelerinin altına düşen bu ortamda, özellikle oksijen bağımlı biyokimyasal reaksiyonlar ve enerji metabolizması

bozulur; bu da hücrel homeostazın sürdürülmesini zorlaştırır (Semenza 2011). Endoplazmik retikulumda oksijen bağımlı protein katlama süreci sekteye uğrar, bu da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur. Bu durum, UPR aktivasyonunu başlatır ve özellikle PERK yolunun hızlı şekilde devreye girmesine neden olur. Glikoz metabolizmasından elde edilen ATP, endoplazmik retikulumda yer alan kalsiyum pompalarının çalışması için gereklidir. Hipoksi ve enerji yetersizliği gibi durumlarda ATP düzeylerindeki azalma, ER’de kalsiyum dengesinin bozulmasına ve protein katlama kapasitesinin düşmesine neden olur. Bu enerji yetersizliği, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini hızlandırarak UPR yanıtının devreye girmesine neden olur (Bi ve ark 2005). ER, hücre içi kalsiyumun depolandığı ana organeldir. Kalsiyumun sitozole sızması veya ER içinde yeterli düzeyde tutulmaması, protein katlanmasını doğrudan bozar. Bu durum özellikle nöronlar gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde hızlı şekilde ER stresine neden olur (Berridge 2002). Bazı virüsler, konak hücreyi istila ettiklerinde protein sentezini artırır ve bu durum ER’ye aşırı yük bindirerek UPR’yi tetikler. Ayrıca bazı viral proteinler doğrudan GRP78’e bağlanarak ER stres sensörlerini serbest bırakabilir (Chan 2014). Reaktif oksijen türleri (ROS), endoplazmik retikulumda yer alan proteinlerin disülfid bağlarını bozarak katlanma sürecini sekteye uğratar ve ER iç ortamının redoks dengesini bozar. Bu durum, hatalı katlanmış proteinlerin birikmesine ve buna bağlı olarak ER stresinin tetiklenmesine neden olur. Oksidatif stresin bu etkisi, özellikle iskemik hasar ve birçok kronik hastalıkta yaygın biçimde gözlenmektedir (Malhotra ve Kaufman 2007). Tunikamisin ve thapsigargin gibi kimyasal ajanlar, sırasıyla N-bağlı glikozilasyonu inhibe ederek ve endoplazmik retikulumun kalsiyum depolarını bozarak ER stresini tetikler. Bu bileşikler, özellikle hücre kültürü çalışmalarında UPR yanıtını yapay olarak indüklemek amacıyla yaygın biçimde kullanılmaktadır (Hetz ve ark 2020). Hipoksi, glikoz eksikliği, oksidatif stres gibi stres faktörleri ER’de yanlış katlanmış protein birikimine neden olarak katlama kapasitesini aşar. Bu birikim, ER stresinin temelini oluşturur ve hücre içi homeostazın bozulmasına yol açar (Hetz 2012). Hücre, bu tip stres koşullarına karşı evrimsel olarak gelişmiş ve karmaşık bir adaptif mekanizma olan UPR ile yanıt verir. UPR; protein katlama kapasitesini artırmak, hatalı proteinleri

uzaklaştırmak ve ER homeostazını yeniden sağlamak amacıyla transkripsiyonel ve translasyonel değişiklikleri tetikler (Hetz 2012).

İskemik koşullar altında endoplazmik retikulumun protein katlama kapasitesi bozulur ve bu durum, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesine yol açar. Bu birikim, hücrenin hayatta kalma ve homeostazı yeniden sağlama amacıyla devreye soktuğu adaptif bir mekanizma olan Katlanmamış Protein Yanıtı'nı (Unfolded Protein Response, UPR) tetikler (DeGracia ve Montie 2004).

PERK, ATF6 ve IRE1 gibi sensörler, ER stresine karşı UPR mekanizmasını aktive ederek protein dengesini yeniden sağlamaya çalışır. Ancak stresin süregitmesi durumunda bu adaptif yanıt yerini proapoptotik sinyallere bırakır; özellikle CHOP transkripsiyon faktörünün artan ekspresyonu, apoptoz sürecinin başlatılmasında kilit rol oynar (Hetz ve Mollereau 2014). Endoplazmik retikulum stresinde PERK, ATF6 ve IRE1 gibi sensörlerin aktivasyonu, başlangıçta protein homeostazını yeniden sağlamak için katlanmamış protein yanıtını (UPR) başlatırken; uzamış ER stresi, CHOP düzeylerinin yükselmesine yol açarak apoptoz mekanizmalarının aktifleşmesine neden olur (Hetz ve Mollereau 2014).

Bu süreç aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına ve sitokrom c salınımına neden olarak hücre ölümünü hızlandırır (Senft ve Ronai 2015).

1.7.2. Endoplazmik Retikulum Stresini Tetikleyen Faktörler

Endoplazmik retikuluma oksijen bağımlı protein katlama süreci, hipoksi gibi stres durumlarında sekteye uğrar. Bu durum, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur ve katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetikler. Özellikle PERK yolu, bu sürecin erken fazında hızla aktive olur (Koumenis ve ark 2002, van den Beucken ve ark 2006).

Endoplazmik retikulumdaki kalsiyum homeostazı, protein katlanmasının doğru şekilde gerçekleşmesi için kritik öneme sahiptir. Kalsiyumun ER'den sitoplazmaya kontrolsüz salınımı, proteinlerin misfoldingine yol açarak UPR'nin aktivasyonuna neden olur. Bu etki, özellikle nöronal hücreler gibi yüksek enerji gereksinimi olan hücrelerde daha hassas biçimde hissedilir (Paschen 2004).

Endoplazmik retikulumda protein katlanması sürecinde disülfid bağlarının oluşumu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine katkıda bulunur. Oluşan oksidatif stres, protein katlama sürecini bozarak ER stresinin gelişmesine yol açabilir (Malhotra ve Kaufman 2007). Tunikamisin ve thapsigargin gibi deneysel kimyasallar, endoplazmik retikulumun fonksiyonlarını bozarak laboratuvar koşullarında ER stresinin indüklenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Boyce ve Yuan 2006). Glikoz eksikliğine bağlı ATP azalması, N-bağlantılı glikozilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları engelleyerek protein stabilitesini bozabilir ve endoplazmik retikulum stresine yol açabilir (Cherepanova ve ark 2016). Bu süreç, UPR yanıtının aktivasyonu ile birlikte inflamatuvar tepkilerin ortaya çıkmasına ve CHOP ekspresyonunun artması yoluyla apoptozun indüklenmesine katkıda bulunabilir (Wu ve ark 2007, Delbrel ve ark 2018).

1.7.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) ve Temel Bileşenleri

ER stresinin başlıca tetikleyicisi, yanlış katlanan veya katlanamayan proteinlerin ER lümeni içinde birikmesidir. Bu durum, ER'nin protein katlama kapasitesini aşarak hücresel işleyişi tehdit eder (Hetz 2012) . Hücre bu duruma yanıt olarak Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) adı verilen bir savunma mekanizmasını aktive eder. UPR; şaperon protein sentezini artırmak, yeni protein sentezini geçici olarak durdurmak ve hatalı proteinlerin yıkım sistemlerini devreye sokmak suretiyle ER homeostazını yeniden kurmayı hedefler (Walter ve Ron 2011). Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR), yalnızca endoplazmik retikulum (ER) ile sınırlı kalmaz; mitokondri ve çekirdek (nükleus) gibi diğer hücresel organellerle de karmaşık sinyal ağları aracılığıyla etkileşim halindedir. ER ile mitokondri arasındaki fiziksel temas alanları olan MAM bölgeleri, kalsiyum akışı ve lipid sentezi gibi süreçlerin koordinasyonunda önemli bir rol üstlenir. Bu organeller arası iletişim, hücresel enerji dengesini düzenlemenin yanı sıra hücrenin hayatta kalma ya da ölme kararlarını da doğrudan etkilemektedir (Vance 2014).

1.7.4. UPR'nin Apoptoz ile İlişkisi

Endoplazmik retikulumun protein işleme kapasitesi aşıldığında, hücre UPR (Unfolded Protein Response) adı verilen bir dizi savunma mekanizmasını aktive eder. Bu yanıtın amacı, protein homeostazını yeniden sağlamak ve hücreyi hayatta tutmaktır (Ron ve Walter 2007). Bu yanıt, ER membranına bağlı üç temel sensör protein -PERK, IRE1 ve ATF6- aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu sensörler; protein katlama kapasitesini artırmak, protein sentezini geçici olarak baskılamak ve hatalı proteinleri yok etmek gibi çeşitli koruyucu yolları harekete geçirir (Hetz 2012). Ancak stresin şiddetli ve uzamış olması durumunda, UPR mekanizmaları proapoptotik sinyallere dönüşebilir. PERK aracılığıyla aktive edilen eIF2 α -ATF4-CHOP aksı, Bcl-2 gibi hücreyi yaşatan proteinleri baskılayarak ve oksidatif stresi artırarak mitokondri üzerinden hücre ölümünü başlatır (McCullough ve ark 2001, Tabas ve Ron 2011). Benzer şekilde, IRE1 üzerinden aktive olan TRAF2-ASK1-JNK sinyal yolu da, hücre ölümünü teşvik eden bir diğer önemli mekanizmadır. JNK aktivasyonu, Bim ve Bid gibi pro-apoptotik proteinleri uyararak mitokondriyal permeabiliteyi artırabilir (Urano ve ark 2000). Ayrıca, IRE1'in uzamış aktivasyonu sırasında devreye giren RIDD (Regulated IRE1-Dependent Decay) mekanizması, hayati mRNA'ların yıkımına yol açarak hücreyi apoptoza daha duyarlı hale getirebilir (Hetz ve Papa 2018). Farelerde kaspaz-12, insanlarda ise kaspaz-4 olmak üzere ER'ye özgü kaspazlar, mitokondriyal bağımsız yoldan hücre ölümünü başlatabilir (Nakagawa ve Yuan 2000, Hitomi ve ark 2004).

Dolayısıyla, UPR başlangıçta koruyucu bir yanıt olmasına rağmen, stresin kontrol altına alınamaması durumunda hücre ölümünü programlayan sinyallere evrilerek apoptozun çok yönlü yollarla aktive olmasına neden olur.

1.7.5. PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP Yolu

ER stresine yanıt olarak aktive edilen membran proteinlerinden PERK, normal koşullarda bağlı olduğu GRP78'in ayrılmasıyla homodimerleşir ve otofosforilasyonla aktif hale gelir. PERK aktivasyonu sonrası, hücresel yanıtın bir parçası olarak bazı hedef proteinlerin fosforilasyonu yoluyla translasyonel süreçler düzenlenir (Harding ve ark 1999). Aktive olan PERK, sitozolde yer alan eukaryotic initiation factor 2 alpha

(eIF2 α)'yı fosforile eder. Bu fosforilasyon, genel protein sentezini baskılayarak endoplazmik retikulum üzerindeki yükü azaltır. Bununla birlikte, seçici olarak bazı stresle ilişkili mRNA'ların, özellikle de ATF4'ün translasyonunun artmasını sağlar (Harding ve ark 2000). ATF4, hücreyi stresten korumak için antioksidan savunma, amino asit taşınımı ve apoptozla ilişkili birçok genin ifadesini düzenler (Pakos-Zebrucka ve ark 2016). ATF4'ün translasyonel olarak artması, hücresel stres yanıtında önemli bir pro-apoptotik transkripsiyon faktörü olan CHOP (C/EBP homolog protein)'un ekspresyonunu artırır. CHOP'un bu şekilde indüklenmesi, özellikle uzun süren veya çözümlenemeyen endoplazmik retikulum stresinde hücre ölümünü tetikleyen önemli bir basamak olarak değerlendirilir (Zinszner ve ark 1998). ER stresinin çözülmemesi durumunda arta CHOP artışı, hayatta kalmayı destekleyen Bcl-2 geninin ekspresyonunu azaltarak apoptozu teşvik eder. Bununla birlikte, CHOP, pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerinin düzeylerini artırarak mitokondriyal membran geçirgenliğinde bozulmaya ve apoptozun başlamasına neden olur. Bu durum, mitokondriyal yolak üzerinden apoptozun başlatılmasında kilit bir rol oynar (Hu ve ark 2018).

1.7.6. IRE1-XBP1s ve RIDD Mekanizması

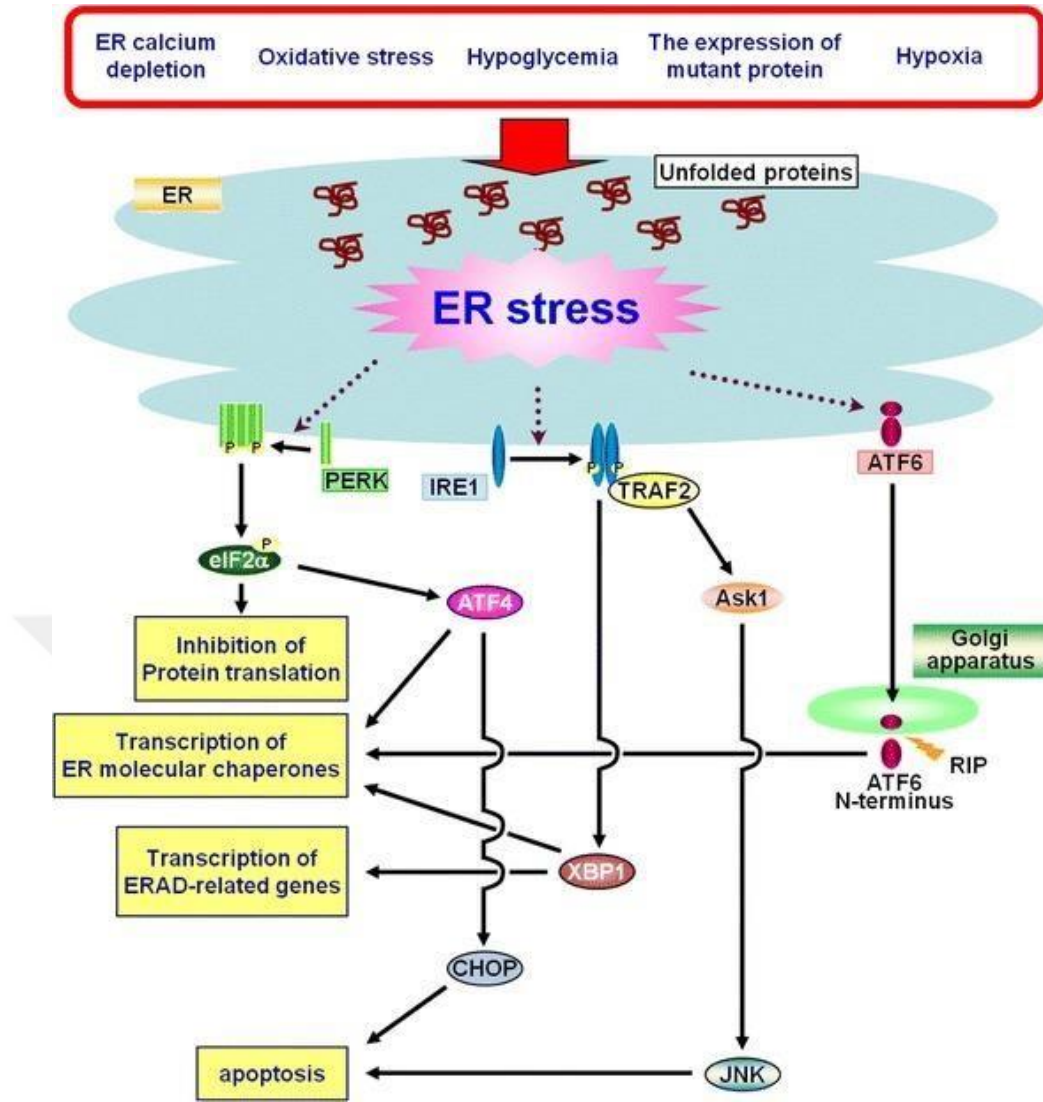
UPR mekanizmaları içinde evrimsel olarak en korunmuş sinyal iletim yolu, endoplazmik retikulum zarında yer alan sensör protein IRE1'e (Inositol-requiring enzyme 1) aittir. IRE1 İlk kez maya hücrelerinde tanımlanan IRE1, ER stresine yanıt veren ve evrimsel olarak korunan bir savunma stratejisi olarak görev yapmaktadır (Tirasophon ve ark 1998). Endoplazmik retikulumda protein katlanma stresinin algılanmasıyla birlikte, membrana bağlı sensör protein IRE1 üzerindeki şaperon GRP78 proteini ayrılır. GRP78'in IRE1'den ayrılmasıyla birlikte, IRE1 homodimerleşerek hem serin-treonin kinaz hem de endoribonükleaz aktivitesi kazanır. Böylece IRE1, hem sinyal iletiminde hem de mRNA işleme süreçlerinde görev almaya başlar (Credle ve ark 2005). IRE1 aktif hale geldiğinde, spesifik olarak XBP1 mRNA'sının kesilmesini (splicing) sağlar. Bu işlem sonucunda ortaya çıkan ve protein katlama kapasitesini artıran genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonel olarak aktif XBP1s izoformu, UPR'ın adaptif fazında kritik bir rol üstlenir (Calton ve

ark 2002). XBP1s, şaperon proteinleri ve ERAD bileşenlerini kodlayan genleri aktive ederek ER fonksiyonlarını destekler (Lee ve ark 2003). Bunun yanı sıra, özellikle hepatositlerde lipogenezle ilişkili genlerin transkripsiyonunu da uyararak lipid biyosentezi üzerinde düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Lee ve ark 2008). Persistan ER stresi durumunda IRE1, RIDD (IRE1'e bağlı düzenlenmiş yıkım) adlı ek bir mekanizmayı devreye alarak mRNA bozunumunu başlatır. Bu süreç, birçok mRNA'nın yıkımına yol açarak hücrel fonksiyonları zayıflatır ve adaptif yanıtın başarısızlığı hâlinde apoptoz gibi geri dönüşsüz sonuçlara neden olabilir (Hetz ve Papa 2018). RIDD mekanizması, yalnızca protein kodlayan mRNA'ları değil, aynı zamanda bazı mikroRNA'ları da hedef alarak inflamatuvar süreçleri etkileyebilir IRE1α'nın RIDD mekanizması, sadece protein kodlayan mRNA'ları değil, aynı zamanda belirli mikroRNA'ları da hedef alarak parçalayabilir. Özellikle, RIDD aracılığıyla miR-17'nin yıkıma uğraması, TXNIP mRNA'nın stabil kalmasına olanak tanır ve bu durum NLRP3 inflamasyonunun aktive olmasına neden olur (Upton ve ark 2012).

1.7.7. ATF6-Golgi Aktivasyonu ve Transkripsiyonel Düzenleme

ATF6, endoplazmik retikulum zarında yerleşik bir transmembran sensör proteindir. Hücrel stres koşullarında, normalde kendisine bağlı olan şaperon GRP78'den ayrıldıktan sonra Golgi aygıtına taşınır. Burada sırasıyla S1P ve S2P proteazları tarafından proteolitik olarak işlenerek aktif forma dönüşür ve çekirdeğe taşınarak hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. Nükleer ATF6, GRP78, GRP94, PDI gibi şaperonların ve ERAD (ER-associated degradation) bileşenlerinin gen ekspresyonunu artırarak protein katlama kapasitesini destekler ve hücre içi proteostazın sürdürülmesine katkı sağlar (Wu ve ark 2007, Yamamoto ve ark 2007).

Bununla birlikte, ATF6 yalnızca şaperon ekspresyonunu değil, aynı zamanda XBP1 mRNA ekspresyonunu da artırarak IRE1 kolunun etkinliğini destekleyici bir rol üstlenir (Wu ve ark 2007).



Tablo 1: Endoplazmik retikulum stresi (Kandel 2013).

1.8. C/EBP homolog protein (CHOP)

CHOP (C/EBP homolog protein), aynı zamanda Ddit3 olarak bilinen ve ER stresi sonucu aktive edilen, hücrenin yaşam-ölüm dengesini belirleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Zinszner ve ark 1998). Genellikle PERK-eIF2 α -ATF4 yolu üzerinden aktive olan CHOP, ATF4'ün translyasyon düzeyinde artmasıyla birlikte belirgin şekilde ekspresse olur (Harding ve ark 2000). CHOP'un temel işlevlerinden biri, anti-apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2'nin gen düzeyindeki ifadesini baskılayarak mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu kolaylaştırmaktır (McCullough ve ark 2001). Pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerinin düzeylerini yükselttiği

gösterilen CHOP, mitokondriyal geçirgenliği artırarak kaspaz kaskadının başlamasına yol açmaktadır (Hu ve ark 2018).

CHOP yalnızca apoptotik genleri değil, aynı zamanda oksidatif stresin artışına neden olan bazı genlerin ekspresyonunu da düzenler. Özellikle ERO1 α 'nın CHOP'un ERO1 α genini yukarı regüle etmesi, disülfid bağ oluşumu sırasında ROS üretimini tetikleyerek oksidatif dengesizliğe neden olur (Marciniak ve ark 2004). Buna ek olarak, CHOP GADD34'ün ekspresyonunu artırarak protein sentezinin yeniden başlatılmasına neden olur ve bu durum hücre döngüsünün G1 fazında duraklamaya yol açabilir(Marciniak ve ark 2004). CHOP'un bu etkileri, hücreyi yalnızca strese karşı duyarlı hâle getirmekle kalmaz, aynı zamanda hasar görmüş hücrelerin proliferasyonunu da engeller.

CHOP'un etkileri hücre tipine göre değişkenlik gösterebilir. Özellikle nöronal hücreler gibi bazı hücre tipleri CHOP aracılı ölüm mekanizmalarına karşı daha hassas olup, bu durum nörodejeneratif süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Silva ve ark 2005). Her ne kadar CHOP'un ekspresyonu büyük oranda PERK-eIF2 α -ATF4 yolu üzerinden regüle edilse de, yapılan çalışmalar CHOP geninin transkripsiyonu yalnızca ATF4 ile değil, ATF6 ve XBP1s gibi UPR bileşenlerinin dolaylı katkılarıyla da şekillenebilmektedir (Oyadomari ve Mori 2004).

Son olarak, CHOP'un yalnızca kaspaz-bağımlı mitokondriyal apoptozu değil, aynı zamanda aşırı oksidatif stres altında aktive olan kaspaz-bağımsız hücre ölüm yollarını da etkileyebileceği öne sürülmektedir. CHOP'un sadece kaspaz-bağımlı değil, parthanatos gibi alternatif ölüm yollarına da dahil olabileceği yönünde bulgular mevcuttur; bu yönüyle CHOP, hücre ölümünün çok yönlü düzenleyicisi olarak değerlendirilmektedir (Oyadomari ve Mori 2004, Fatokun ve ark 2014).

1.8.1. Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2)

Bcl-2, mitokondriyal (intrinsik) yol üzerinden programlanmış hücre ölümünü düzenleyen ve hücresel yaşamsal bütünlüğü destekleyen temel anti-apoptotik proteinlerden biridir. Bcl-2 ailesi, hem anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) hem de

pro-apoptotik (Bax, Bak, Bid, Bim) üyeleri içeren geniş bir protein grubudur ve bu üyeler arasındaki denge, hücre kaderini belirlemede kritik bir rol oynar (Youle ve Strasser 2008).

Bcl-2, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini dengeleyerek Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlerin mitokondriye taşınmasını önler ve böylece sitokrom c salınımını baskılar (Kale ve ark 2018). Bu mekanizma sayesinde Bcl-2, apoptotik sinyalin mitokondri üzerinden başlatılmasını baskılar. ER stresine maruz kalan hücrelerde, Bcl2 düzeyinin azalması hücreyi apoptoza karşı savunmasız hâle getirirken, Bcl-2'nin overekspresyonu ER kaynaklı hücre ölümünü belirgin şekilde azaltabilir (Puthalakath ve ark 2007).

UPR yanıtının pro-apoptotik faza evrilmesinde görev alan CHOP'un, Bcl-2 geninin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonel düzeyde baskı oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu baskılanma, hücrenin stresle baş etme kapasitesini düşürürken, aynı zamanda mitokondriyal yol üzerinden apoptozun başlatılmasına olanak tanır (McCullough ve ark 2001). Bcl-2 ayrıca sadece mitokondri değil, endoplazmik retikulum membranı üzerinde de lokalize olabilir ve bu bölgede kalsiyum homeostazının düzenlenmesine katkı sağlar (Scorrano ve ark 2003). Bu özelliğiyle Bcl-2, yalnızca apoptozun engellenmesinde değil, aynı zamanda ER stresine karşı sitoprotektif yanıtların koordinasyonunda da görev alır.

Bazı çalışmalarda, Bcl-2'nin oksidatif stres koşullarında ROS üretimini sınırlayarak mitokondriyal fonksiyonu desteklediği ve böylece redoks homeostazının sürdürülmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Gross ve ark 1999). Dolayısıyla Bcl-2, yalnızca apoptozu engelleyen bir unsur değil, aynı zamanda hücrel metabolik yanıtların modülasyonuna da katkı sağlayan çok yönlü bir regülatör olarak tanımlanabilir.

1.8.2. HSP70 (Heat Shock Protein 70)

Hücrel stresle mücadelede önemli görevler üstlenen HSP70, evrimsel süreçte korunmuş bir şaperon ailesine mensup proteinlerden biridir. Normal fizyolojik

koşullarda proteinlerin katlanma sürecini denetler, yanlış katlanmış proteinleri yeniden şekillendirir veya proteazlara yönlendirir. Farklı çevresel stres faktörleri (örneğin ısı, toksik maddeler, hipoksi ve ER stresi), HSP70 ekspresyonunun belirgin şekilde yükselmesine yol açmaktadır (Lindquist ve Craig 1988, Mayer ve Bukau 2005). Bu artış, hücrenin proteostatik yükünü dengelemesine ve hayatta kalım şansını artırmasına hizmet eder.

Denatüre proteinlerin kümelenmesini engelleyerek proteostatik dengeyi sağlamak, HSP70'in temel görevlerinden biridir. Bu bağlamda HSP70, hem ER hem de mitokondri ile ilişkili bölgelerde lokalize olarak stres altında bozulan protein dengesini yeniden tesis etmeye çalışır (Evans ve ark 2010). Ayrıca HSP70, hücre içi Ca^{2+} dengesini ve redoks durumunu düzenleyen protein kompleksleriyle etkileşerek, ER stresine karşı sitoprotektif bir yanıt oluşturur (De Maio 1999).

Apoptoz süreciyle ilişkili olarak, HSP70'in birçok basamakta hücre ölümünü baskılayıcı etkileri olduğu gösterilmiştir. SP70, Apaf-1 ve sitokrom c kompleksinin oluşumunu önleyerek apoptozun gelişmesini ve dolayısıyla kaspaz-9 aktivasyonunu engeller (Beere ve ark 2000). Ayrıca mitokondriyal dış zarın geçirgenliğini azaltarak Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin mitokondriye translokasyonunu engellediği bildirilmektedir (Garrido ve ark 2001). Pro-apoptotik sinyal proteinleri (örneğin JNK, p38 MAPK, ASK1) üzerindeki inhibisyon etkisiyle HSP70, hücre ölüm sinyallerini baskılar (Gabai ve Sherman 2002, Park ve ark 2002).

Bununla birlikte, HSP70 sadece kaspaz-bağımlı değil, kaspaz-bağımsız ölüm yollarını da regüle edebilir. Örneğin AIF (Apoptosis-Inducing Factor) gibi mitokondriyal faktörlerin nükleusa translokasyonunu engelleyerek hücreyi nekroptoz ve parthanatos gibi alternatif ölüm yollarına karşı koruyabileceği gösterilmiştir (Ravagnan ve ark 2001). Bu çok yönlü etkileri nedeniyle HSP70, nöronal hücrelerde, kardiyomiyositlerde ve böbrek epitel hücrelerinde çeşitli patolojik koşullar altında koruyucu bir biyomoleküler bariyer görevi görmektedir.

Nörodejeneratif hastalık, inme ve iskemik reperfüzyon hasarı gibi durumlarda HSP70 düzeylerinin artması, hücre sağkalım ve fonksiyonların korunması ile pozitif

korelasyon göstermektedir. Özellikle beyin iskemisi modellerinde HSP70'in overekspresyonu, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz üzerinde baskılayıcı etkiler göstermiştir (Muchowski ve Wacker 2005). Deneysel çalışmalarda intravenöz olarak verilen Fv-HSP70 proteini, beyin infarkt hacmini önemli ölçüde (%68) azaltmış ve motor fonksiyonları iyileştirmiştir (Zhan ve ark 2010). Bu nedenle HSP70, yalnızca bir stres proteini değil, aynı zamanda hücrel yaşam ile ölüm arasındaki dengeyi belirleyen bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir.

1.8.3. GPR78

Yaklaşık 70 kDa ağırlığında olan GRP78, endoplazmik retikulum lümeninde konumlanan ve protein katlanmasını düzenleyen önemli bir şaperon proteindir. BiP olarak da bilinen GRP78, HSP70 protein ailesine dahil olup ER stres tepkisinin ana düzenleyicilerindendir (Lee 2001). Normal fizyolojik koşullarda, yeni sentezlenen polipeptidlerin doğru katlanmasını sağlamak, yanlış katlanmış proteinleri stabilize etmek veya bunları ERAD (ER-associated degradation) yoluyla yıkıma yönlendirmek gibi görevler üstlenir (Ni ve Lee 2007). UPR (Unfolded Protein Response) aktivasyonunun başlatılmasında temel bir rol oynayan GRP78, normalde PERK, IRE1 ve ATF6 gibi ER stres sensörleriyle kompleks hâlinedir ve bu sensörlerin inaktif kalmasını sağlar (Bertolotti ve ark 2000). Stres koşullarında yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, GRP78'in PERK, IRE1 ve ATF6'dan ayrılarak bu proteinlere bağlanmasına yol açar; böylece UPR aktivasyonu başlar (Kopp ve Lajoie, 2017). GRP78, stres koşullarında hem algılayıcı hem de düzenleyici protein işlevi görerek çift yönlü görev üstlenir (Kopp ve ark 2019). Stres koşullarında GRP78'in ekspresyonu artarak hücrenin proteostatik yükünü hafifletir, protein katlama kapasitesini artırır ve adaptif hayatta kalım mekanizmalarını destekler. GRP78 yetersizliğinde UPR başarısız olur ve bu durum CHOP ile caspase-12 gibi ölüm yolaklarının aktive olmasına neden olur (Oyadomari ve Mori 2004). Ayrıca GRP78, kalsiyum bağlama kapasitesi sayesinde ER kalsiyum homeostazının korunmasına katkıda bulunur ve mitokondri-

ER arası Ca^{2+} geçişini düzenleyerek mitokondriyal yolla ilerleyen apoptoz sürecine dolaylı olarak müdahale eder (Rizzuto ve ark 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, GRP78'in yalnızca ER ile sınırlı kalmayıp, mitokondri, plazma membranı, nükleus ve ekzosom gibi hücre içi ve dışı çeşitli yapılarda da lokalize olabileceğini göstermiştir. Hücre yüzeyindeki GRP78 (csGRP78), özellikle kanser hücrelerinde yüksek düzeyde bulunur ve PI3K/Akt gibi sinyalleri aktive ederek hücre çoğalmasını destekler (Gonzalez-Gronow ve ark 2006, Lee 2014). GRP78'in immün sistemle etkileşimi, son yıllarda artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. Özellikle hücre yüzeyinde bulunan GRP78 (csGRP78), bazı viral enfeksiyonlarda konak hücre yüzeyinde reseptör olarak görev yaparak viral girişe aracılık edebilir. A csGRP78 hedefli otoantikör temelli tanı ve tedavi stratejileri, hem tümör hem de enfeksiyon hastalıkları için yeni bir yaklaşım sunmaktadır (Ge ve Kao 2019, Gonzalez-Gronow ve ark 2021).

Tüm bu bulgular doğrultusunda GRP78, yalnızca ER stresinin yönetiminde değil, aynı zamanda hücre sağkalımı, apoptoz, kalsiyum dengesi, tümör progresyonu, enfeksiyon patogenezi ve immün yanıt gibi çok sayıda biyolojik sürecin merkezinde yer alan pleiotropik bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle GRP78, hem bir hastalık biyobelirteci hem de tedavi hedefi olarak modern moleküler biyolojide yoğun araştırma konusu hâline gelmiştir.

1.9. Flavonoidler

Sebze, meyve, çay ve şarap gibi bitkisel ürünlerde bolca bulunan flavonoidler, doğal fenolik bileşikler sınıfına girer ve güçlü redoks düzenleyici özelliklere sahiptir (Middleton ve ark 2000). Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve geleneksel tıpta sıkça kullanılan sekonder metabolitlerdir. Flavonoidler, fenilbenzo- γ -piron iskeletine sahip olup, C6-C3-C6 karbon yapısıyla karakterize edilen polifenolik maddelerdir (Panche ve ark 2016). İki aromatik halka ve üç karbonluk bir köprüden oluşan moleküler yapı sayesinde flavonoidler, çeşitli alt gruplara ayrılabilir (Kumar ve Pandey 2013). Flavonoidler, fenilbenzo- γ -piron iskeletine sahip olup, C6-C3-C6 karbon yapısıyla karakterize edilen polifenolik maddelerdir (Panche ve ark 2016). İki aromatik halka ve üç karbonluk bir köprüden oluşan moleküler yapı sayesinde

flavonoidler, çeşitli alt gruplara örneğin flavon, flavonol, flavanon vb ayrılabilir (Kumar ve Pandey 2013). Flavonlar, C halkasında 2,3 çift bağı ve 4-oxo grubu içeren flavonoid grubudur. Kuersetin, kampferol ve mirisetin gibi bileşenler bu gruba dahildir ve güçlü antioksidan ile antiinflamatuvar özelliklere sahiptirler (Panche ve ark 2016).

Flavanonlar ise C halkasında 2,3 çift bağı bulunmayan ancak 4-oxo grubu içeren bileşiklerdir. Hesperetin ve naringenin flavanon grubu örneklerindedir ve hem antioksidan hem de metabolik düzenleyici etkiler gösterirler (Panche ve ark 2016).

Flavonoller, flavonlara benzer yapıya sahip olmakla birlikte ekstra hidroksil grupları içerirler. Kampferol ve kuersetin bu gruba örnek olarak verilebilir. Bu bileşikler, serbest radikal süpürücü etkileriyle öne çıkarlar (Agati ve ark 2012). İzoflavonlar, flavonoidlerin B halkasının C3 pozisyonundan C2 pozisyonuna kaymasıyla farklı bir yapıya sahip olup genistein ve daidzein gibi bileşenleri içerir. Östrojen benzeri etkileri nedeniyle hormon düzenleyici özellik gösterirler (Cassidy ve ark 2006).

Antosiyaninler, flavylum iyonu yapısına sahip, suda çözünebilen pigmentlerdir ve bitkilere kırmızı, mavi ve mor renklerini verirler. Siyanosidin (Cyanidin) gibi bileşenleri kapsayan antosiyaninler güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahiptirler (Khoo ve ark 2017). Flavanoller veya kateşinler, doymuş C halkasına sahip flavonoid bileşiklerdir ve epikateşin ile kateşin gibi bileşenlerden oluşur. Bu grup, özellikle kardiyovasküler koruma sağlayan güçlü antioksidan özellikleriyle bilinir (Xu ve ark 2025). Bu bileşikler, antioksidan özelliklerinin yanı sıra antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antidiyabetik etkilerle de öne çıkar (Kicinska ve Jarmuszkiewicz 2020). Flavonoidlerin yapısında yer alan hidroksil grupları, serbest radikalleri doğrudan etkisiz hale getirebilme yetenekleri sayesinde, oksidatif stresin neden olduğu hücrel zararları azaltmada önemli rol oynar (Heim ve ark 2002).

Flavonoidlerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri, moleküler yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve konumuna, metal iyonlarını şelatlama kapasitelerine, Fenton reaksiyonu gibi süreçlerle oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize etme yeteneklerine ve C2-C3 çift bağının varlığı gibi yapısal özelliklerine bağlı olarak şekillenmektedir. Bu yapısal özellikler, flavonoidlerin biyolojik hedeflerle etkileşime girerek spesifik biyolojik yanıtları tetikleme potansiyelini belirler (Jomova ve ark 2025). Flavonoidler, yalnızca serbest radikalleri doğrudan nötralize etmekle kalmaz,

aynı zamanda endojen antioksidan sistemleri de uyararak redoks homeostazına katkı sağlarlar (Boots ve ark 2008). Bu süreçlerin çoğu, Nrf2 sinyal yolunun aktive edilmesi ile gerçekleşir. Nrf2'nin nükleer translokasyonu, antioksidan yanıt elementlerini (ARE) aktive ederek antioksidan ve sitoprotektif genlerin ekspresyonunu artırır (Scapagnini ve ark 2011). Flavonoidler, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayarak nöroinflamatuvar yanıtı azaltabilirler (Chen ve ark 2022).

Flavonoidlerin hücresele düzeydeki koruyucu etkileri, sadece serbest radikalleri temizlemekle sınırlı kalmayıp, mitokondriyal fonksiyonların sürdürülebilirliğine de katkı sağlamaktadır. Özellikle quercetin gibi flavonoidlerin, mitokondriyal membran potansiyelini koruyarak ROS üretimini sınırladığı ve bu sayede hücresele hasarı azalttığı gösterilmiştir (Davis ve ark 2009). Flavonoidlerin Nrf2 yolunu aktive ederek mitokondriyal biyogenezi desteklediği ve bu sayede nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (Villavicencio Tejo ve Quintanilla 2021). Bu mekanizmalar doğrultusunda, flavonoidlerin yalnızca akut stres yanıtlarında değil, aynı zamanda uzun vadeli mitokondriyal stabilitenin korunmasında da terapötik potansiyel taşıdığı bildirilmektedir (Boots ve ark 2008). Flavonoidlerin alt sınıfları, gıdalardaki bolluğu, ürettikleri metabolitler ve olası sağlık etkileri bakımından farklılık gösterir (Sergiel 2024).

Besin yoluyla alınan flavonoidlerin fizyolojik etkileri, sadece yapısal çeşitliliklerine değil, aynı zamanda biyoyararlanımlarına da bağlıdır. Sindirim sisteminde emildikten sonra Karaciğerde Faz II metabolizmasıyla glukuronidasyon ve sülfatlama süreçlerine girerek sistemik dolaşıma katılırlar (Manach ve ark 2005). Bu metabolitler, plazma proteinlerine bağlanarak hedef dokulara taşınabilir ve özellikle merkezi sinir sisteminde çeşitli biyolojik aktiviteler gösterebilir (Del Rio ve ark 2013). Flavonoidlerin metal iyonları ile kompleks oluşturma yetenekleri, özellikle demir (Fe²⁺/Fe³⁺) ve bakır (Cu²⁺) gibi geçiş metalleriyle olan etkileşimleri sayesinde antioksidan aktivitelerine önemli katkılar sağlar. Bu kompleksleşme, metal iyonlarının Fenton reaksiyonu gibi serbest radikal üretim yollarına katılımını engelleyerek oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olur (Cherrak ve ark 2016)

Flavonoidlerin nöroprotektif etkileri, hücre içi stres yanıtını düzenleyen MAPK, PI3K/Akt ve Nrf2 gibi sinyal yolları üzerinden etki gösterebilir (Costa ve ark 2016). Flavonoidlerin bilişsel işlevleri desteklemede rol oynayabileceği; özellikle nöronları oksidatif strese bağlı hasardan koruyarak ve nöroenflamasyonu baskılayarak öğrenme ve hafıza süreçlerini iyileştirdiği bildirilmiştir (Spencer 2008). Bu etkiler flavonoidlerin sinir sistemi hastalıklarında terapötik potansiyellerini artırmaktadır (Vauzour ve ark 2008). Güncel çalışmalar, kaempferol gibi flavonoidlerin endoplazmik retikulum (ER) stresine bağlı hücre hasarı azaltabildiğini göstermektedir. Bu etki, GRP78, CHOP ve caspase-12 gibi ER stres belirteçlerinin ekspresyonunun azalmasıyla ilişkilidir (Abdullah ve Ravanan 2018).

1.9.1. 3',4'-Dihydroxyflavonoid

Flavonoid ailesinde yer alan 3',4'-dihydroxyflavonoidler, B halkasında 3' ve 4' konumlarında yer alan hidroksil gruplarıyla tanımlanır (Rice-Evans ve ark 1996). Bu moleküller konfigürasyon, katekol benzeri yapılar oluşturarak flavonoidlerin redoks potansiyelini artıran temel faktörlerden biridir (Rice-Evans ve ark 1996). Bu motif, flavonoidlerin serbest radikalleri etkisizleştirmesini sağlayan hidrojen ve elektron donörlüğü işlevini yerine getirir (Heim ve ark 2002). Flavonoidlerin antioksidan etkisi, yalnızca serbest radikalleri doğrudan nötralize etme kapasitelerine değil, aynı zamanda hücre antioksidan savunma sistemlerini aktive etme yeteneklerine dayanmaktadır (Pietta 2000).

Özellikle 3',4'-dihydroxyflavonoid yapısına sahip flavonoidlerin, Nrf2/ARE yolunu aktive ederek hücre içi redoks dengesini koruyan endojen antioksidanların ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Xu ve ark 2022). Bu flavonoid alt grubuna dahil olan quercetin, luteolin ve kaempferol gibi moleküller, nöroprotektif etkileri ile de dikkat çekmektedir (Spencer 2008). Bu grup içinde yer alan DiOHF, hem B halkasındaki 3',4' hidroksil grupları hem de flavonoidlerin karakteristik 3-hidroksil yapısını içerir. Bu yapısal bütünlük, DiOHF'e güçlü bir antioksidan etki sağlamanın yanında, metal iyonlarını bağlama yeteneği de kazandırır (Williams ve ark 2004).

Yakın zamanda yapılan deneysel çalışmalarda, 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF)'ün serebral iskemi-reperfüzyon modeli gibi oksidatif stresin yoğun olduğu durumlarda hücre içi dengeyi koruduğu ve apoptoz oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Dasdelen ve ark 2024). Üzüm ekirdeği proantosiyanidin ekstresi (GSP), CHOP, GRP78 ve kaspaz-12 gibi endoplazmik retikulum stres belirteçlerinin ekspresyonunu azaltarak nöronal apoptozu baskılamıştır. Bu bulgular, yapısal olarak benzer olan DiOHF gibi flavonoidlerin de benzer etki mekanizmalarına sahip olabileceğini düşündürmektedir (Fu ve ark 2019). Tüm bu veriler, 3',4'-dihydroxyflavonoid yapısına sahip bileşikleri özellikle DiOHF'nin çok yönlü nöroprotektif etkiler gösterebileceğini ve serebral iskemi-reperfüzyon gibi karmaşık patofizyolojik durumlarda terapötik potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır. İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, serebral dolaşımın geçici olarak kesintiye uğraması ve ardından yeniden sağlanması sonucu gelişen, oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümü ile karakterize kompleks bir süreçtir (Kalogeris ve ark 2012). Bu süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, hücre içi redoks dengesinin bozulmasına, mitokondriyal disfonksiyona ve endoplazmik retikulum stresine neden olur (Li ve ark 2025).

Hayvan deneyleri, DiOHF tedavisinin İ/R hasarı sonrası nöronlarda apoptoz oranını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Cetin ve ark 2025). Kognitif fonksiyonlara etkisi açısından da umut verici bulgular elde edilmiştir; DiOHF uygulanan ratlarda Morris su labirenti testi gibi davranışsal testlerde bilişsel performansın anlamlı şekilde iyileştiği bildirilmiştir (Wang et al., 2024). DiOHF ve DiOHF-6-SA, reperfüzyon sonrasında kalp kasılma fonksiyonunu iyileştirmiş, LDH salınımını azaltmış ve eNOS ekspresyonunu korumuştur (Qin ve ark 2011). DiOHF'nin, geçici global iskeminin neden olduğu mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarını düzelttiği, ancak anksiyete benzeri davranışlar üzerinde belirgin bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür (Oz ve ark 2017). 3',4'-Dihidroksiflavonol (DiOHF), iskemi-reperfüzyon sonrası vasküler fonksiyonları iyileştirme potansiyeline sahip bir flavonoiddir. Yapılan alışmalar, DiOHF'nin oksidatif stresi azaltarak ve nitrik oksit biyoyararlanımını artırarak vasküler genişlemeyi desteklediğini

göstermektedir (Chan ve ark 2003). Uygulanan DiOHF tedavisinin, iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu serebellum ve hipokampüsteki apoptoz artışını anlamlı düzeyde baskıladığı ve bu etkinin özellikle tedavinin iskemiden önce uygulanması durumunda belirgin olduğu tespit edilmiştir (Dasdelen ve ark 2024).

1.9.2. Flavonoidlerin CHOP Üzerine Etkileri

CHOP (C/EBP homologous protein), ER stres yanıtı sürecinde yer alan ve özellikle uzun süreli stres koşullarında apoptoz mekanizmalarını devreye sokan temel transkripsiyon faktörlerinden biridir. PERK-eIF2 α -ATF4 yolakları üzerinden aktive edilen CHOP, protein katlanma bozuklukları durumunda proapoptotik genlerin ifadesini artırarak hücre ölümüne neden olur (Oyadomari ve Mori 2004).

Naringenin tedavisi, deneysel travmatik beyin hasarı modelinde CHOP düzeylerini azaltarak ER stresini hafiflettiği gösterilmiştir (Deng ve ark 2021).

Kaempferol uygulamasının, d-GalN/LPS ile oluşturulan akut karaciğer yetmezliği modelinde CHOP ekspresyonunu azaltarak ER stres kaynaklı hücre ölümünü sınırladığı ve GRP78 seviyelerini artırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark 2019). Scutellaria baicalensis bitkisinden elde edilen baicalein, oksidatif hasarı azaltarak ve hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaları etkileyerek nöroprotektif faydalar sağlamaktadır. Özellikle CHOP ekspresyonunun inhibisyonu, baicaleinin antiapoptotik etkilerinin temel mekanizmalarından biridir. Baicalein uygulanan spinal kord I/R modeli farelerde, CHOP düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı ve bunun apoptotik süreci baskıladığı gözlemlenmiştir (Wu ve ark 2020). Üzüm çekirdeği proantosiyandinleri (GSP) gibi polifenolik yapıda flavonoidler de CHOP düzeylerini azaltarak endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptozu baskılamış ve nöronları korumuştur. Bu etkinin, flavonoidlerin ER şaperon proteinleri ve oksidatif stresle ilişkili sinyal yollarını modüle edici özellikleri ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Fu ve ark 2019). I/R, PERK yolu ile ilişkili olan p-PERK, ATF4 ve CHOP proteinlerinin ekspresyonunu artırmaktadır. Hiperglisemik serebral I/R hasarında kuersetinin nöroprotektif etkisi; kan glukoz düzeylerinin düşürülmesi, apoptozun baskılanması ve ER stresinin inhibisyonu ile ilişkilidir (Yang ve ark 2025).

3',4'-Dihidroksiflavonol (DiOHF), tunikamisin ile oluşturulan endoplazmik retikulum stresine karşı insan endotel hücrelerinde koruyucu etki göstermiş; bu etki CHOP ve GRP78 gibi stresle ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerini azaltarak apoptozun engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Lau ve ark 2018). CHOP'un hücre ölüm yollarındaki temel rolü, onu hedefleyen biyolojik müdahaleleri terapötik açıdan önemli hale getirmektedir. Flavonoid türevleri, bu bağlamda CHOP ekspresyonunu baskılayarak endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptozu azaltabilmekte ve iskemik beyin hasarı gibi durumlarda nöroprotektif potansiyel göstermektedir (Choi ve ark 2010, Fu ve ark 2019).

1.9.3. Flavonoidlerin HSP70 Üzerine Etkileri

Hsp70, hücre içi protein homeostazını korumada kritik rol oynayan bir moleküler şaperondur; proteinlerin katlanmasına yardımcı olur, agregasyonu önler ve stres koşullarında yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasını veya yıkımını destekler (Daugaard ve ark 2007). Hsp70, iskemik hasar gibi stresli durumlarda hücrelerin korunmasında kritik bir rol oynar (Shao ve ark 2019). Baicalin'in, global serebral iskemi-reperfüzyon modelinde HSP70 ekspresyonunu artırdığı, aynı zamanda GABAerjik sistem üzerinde düzenleyici etki göstererek nöroprotektif yanıtları desteklediği bildirilmiştir (Dai ve ark 2013). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksijenin (O₂) varlığı, HSP70 gibi sinyal yollarının etkili şekilde engellenmesiyle STAT3'ün artan ifadesi cisplatin ile tedavi edilen sıçanlarda makrofajların anti-inflamatuar tip 2 fenotipe dönüşmesini sağlayarak böbrekteki oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümünü önemli ölçüde azaltmıştır (Saad ve ark 2024). Silymarin'in mezenterik iskemi-reperfüzyon modelinde HSP70 düzeylerini yükselterek doku üzerindeki oksidatif stres yükünü azalttığı ve hücrel stres yanıtını modüle ettiği rapor edilmiştir (Demir ve ark 2014). Kırmızı şarapta bulunan polifenolik bileşiklerin, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında HSP70 ekspresyonunu teşvik ederek kardiyomiyositleri oksidatif hasardan koruduğu belirlenmiştir (Sato ve ark 2002). HSP70, hücre içi proteinlerin katlanmasını düzenlemenin yanı sıra, apoptoz mekanizmalarını baskılayarak hücre sağkalımını artırır. Bu nedenle, flavonoidlerin HSP70 seviyelerini azaltması, özellikle kanser tedavisinde faydalı bir strateji olabilir.

Örneğin hesperetin, akciğer kanseri hücrelerinde HSP70 proteinini baskılayarak mitokondriyel apoptoz yolunu aktive etmiş, böylece hücre ölümünü desteklemiştir (Tanaka ve ark 2022). Buna karşılık, naringenin gibi bazı flavonoidler ise endotel hücrelerinde HSP70 düzeylerini artırarak yüksek glukoz kaynaklı oksidatif hasarı azaltmış ve hücreleri koruyucu bir etki göstermiştir (Zhang ve ark 2022). HSP70 proteini, miyokardiyal iskemi sonrasında kardiyomiyositlerin hayatta kalmasını destekleyerek oksidatif stresi azaltır. Flavonoidlerin ise HSP70 ekspresyonunu artırarak bu koruyucu süreci modüle ettiği prelinik modellerde gösterilmiştir (Zhao ve ark 2007). Flavonoidler, iskemi-reperfüzyon kaynaklı hücresel stres durumlarında HSP70'in indüksiyonunu artırarak protein katlanma sürecini destekler, mitokondriyal fonksiyonu korur ve apoptozu baskılar; bu mekanizma, bu bileşiklerin potansiyel terapötik etkilerini açıklamada önemlidir

1.9.4. Flavonoidlerin GRP78 Üzerinde Etkileri

Endoplazmik retikulum (ER), protein katlanması, kalsiyum dengesi ve lipid biyosentezi gibi hayati hücresel işlevlerin gerçekleştiği bir organeldir. Bu işlevlerin bozulması durumunda, hücre 'Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)' isimli adaptif yanıt mekanizmasını devreye alarak hayatta kalmaya çalışır GRP78, UPR'ın merkezi regülatörlerinden biri olup aynı zamanda ER stresine karşı erken dönemde artış gösteren önemli bir biyobelirteçtir (Lee 2005).

Flavonoidler, hücresel işlevleri modüle etme ve çeşitli hastalık süreçlerini iyileştirme potansiyeline sahip doğal bileşiklerdir. Bu bileşiklerin, özellikle endoplazmik retikulum (ER) stresine karşı hücrelerin adaptif yanıtlarını düzenleme yeteneği öne çıkmaktadır. GRP78 (Glukoz-Regüle Edilen Protein 78), ER stresine karşı hücresel bir savunma mekanizmasının anahtar düzenleyicisidir. Örneğin luteolin, insan kolon kanseri hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini baskılayarak GRP78 düzeylerini anlamlı şekilde azaltmıştır. GRP78 seviyelerindeki düşüş, CHOP ve caspase-12 ekspresyonunun da azalmasına neden olmuş ve bu sayede hücresel sağkalım artmıştır (Omar ve ark 2016). Quercetin, flavonol sınıfına ait bir flavonoid olup, ER stresini azaltarak GRP78 ekspresyonunu düşürebilir. Bir çalışmada,

quercetin'in GRP78, GADD153 ve sitozolik sitokrom C düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir. Bu etki, quercetin'in antioksidan özellikleri ve ER stresini doğrudan modüle etme kapasitesiyle ilişkilidir (Keylani ve ark 2022). Bununla birlikte bazı flavonoidlerin GRP78'i artırıcı etkiler gösterebildiği de bildirilmektedir. Naringenin, yüksek glukozla indüklenen insan endotel hücrelerinde GRP78 ekspresyonunu artırarak hücrel stresle başa çıkma kapasitesini güçlendirmiştir. Bu bulgu, flavonoidlerin etkisinin hücrel bağlamın koşullarına göre değişebileceğini göstermektedir. GRP78'in yükselmesi bazı durumlarda hücrede hasar değil, aksine homeostazın sağlanmasına yardımcı olabilir (Yan ve ark 2023). Ayrıca, üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi (GSP) gibi polifenolik bileşikler, GRP78 ve CHOP gibi stres belirteçlerinin baskılanmasında etkili bulunmuştur. Fu ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında, GSP tedavisi, nöronal hücrelerde ER stres kaynaklı apoptozun azaltılması yoluyla hücre kaybının önlenmesinde etkili bulunmuştur. Bu durum, flavonoidlerin hem ER stresine karşı savunma sağladığını hem de nörodejeneratif süreçlerde terapötik potansiyel taşıdığını göstermektedir (Fu ve ark 2019).

Baicalein'in hepatoselüler karsinom hücrelerinde uygulandığı çalışmalarda, endoplazmik retikulum stresi aracılığıyla hem apoptoz hem de otofajinin uyarıldığı, bu süreçte GRP78 düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2014). Üzüm çekirdeği ekstresi, sisplatin kaynaklı nefrotoksisite modelinde GRP78 ve caspase-12 düzeylerini düşürerek ER stresine bağlı apoptotik süreci sınırlamıştır (Gao ve ark 2014). İkaridin (ICA), geleneksel Çin tıbbında kullanılan Epimedium bitkisinden elde edilen bir flavonoiddir. ICA'nın, glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78) ifadesini baskıladığı gösterilmiştir. Bu bulgular, ICA'nın endoplazmik retikulum stresi aracılığıyla gelişen inflamasyonu engelleyerek iskemik inme karşısında nöroprotektif etki gösterebileceğini düşündürmektedir (Zheng ve ark 2022).

1.9.5. Flavonoidlerin Bcl-2 Üzerindeki Etkileri

Bcl-2 proteini, mitokondriyal zarın bütünlüğünü koruyarak hücrel ölüm sinyallerini engelleyen önemli bir anti-apoptotik faktördür (Youle ve Strasser 2008). Bu protein, özellikle sitokrom c salınımını önleyerek kaspaz kaskadının aktive olmasını engeller ve hücre sağkalımını destekler (Cory ve Adams 2002). BCL2 ailesi

proteinleri, işlevsel rollerine ve BH (BCL-2 homoloji) alanı sayısına göre üç temel gruba ayrılır: anti-apoptotik etkili çok alanlı proteinler (örneğin BCL2, BCL-XL, BCL-w, MCL1, BCL2A1 ve BCLB), pro-apoptotik etkili çok alanlı proteinler (BAK, BAX ve BOK) ve yalnızca BH3 bölgesini taşıyan pro-apoptotik proteinler (BID, BIM, BAD, BIK, NOXA, PUMA, BMF ve HRK). Bu ayırım, Bcl-2 ailesinin apoptozun düzenlenmesinde çok yönlü bir kontrol noktası oluşturduğunu göstermektedir (Vogler ve ark 2025).

Flavonoidlerin sinyal yolları üzerindeki etkisi, hücre ortamının durumuna göre değişiklik gösterebilir. Özellikle PI3K/Akt yolunun aktivasyonu Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücre sağkalımını desteklerken; bu yolun inhibisyonu, Bcl-2 düzeylerinde azalmaya ve apoptozun hızlanmasına yol açabilir (Datta ve ark 1997, Song ve ark 2005). Sıçanlarda yapılan bir deneysel serebral İ/R modelinde, kaempferol uygulamasının Bcl-2 düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı, buna karşın Bax ve caspase-3 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu değişiklikler, iskemik alanda apoptotik hücre sayısının azalmasına katkıda bulunmuştur (Verma ve ark 2024).

Quercetin'in apoptotik mekanizmalar üzerindeki etkileri, özellikle Bcl-2 ailesi proteinlerinin regülasyonu yoluyla belirgin hale gelmektedir. Niu ve ark. (2011), HL-60 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, quercetin'in Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını ve aynı zamanda pro-apoptotik Bax protein düzeyini artırarak hücre ölümünü indüklediğini bildirmiştir (Niu ve ark 2011). Benzer şekilde, fisetin adlı flavonoid, insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini baskılamış ve buna karşılık proapoptotik faktör olan kaspaz-3 aktivitesini artırmıştır (Khan ve ark 2008). Buna karşılık bazı flavonoidler, özellikle oksidatif stres veya iskemik koşullar altındaki hücre modellerinde, Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücreyi koruyucu etki göstermektedir. Örneğin üzüm çekirdeği proantosiyandinleri (GSP), oksijen-glikoz yoksunluğu/reoksijenasyon (OGD/R) uygulanan N2a hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini artırmış ve apoptotik belirteçleri baskılamıştır (Fu ve ark 2019). Nobiletin, iskemikreperfüze beyin dokusunda uygulandığında, Bcl-2 düzeylerini artırarak mitokondriyal zar stabilitesini korumuş; bu sayede apoptoz sinyallerinin yayılımını engellemiştir.

Aynı zamanda p53 ve Bax gibi pro-apoptotik moleküllerde baskılanma gözlenmiştir (Yasuda ve ark 2014). Icarin ve türevi icaritin, orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) modeliyle oluşturulan iskemik beyin hasarında Bcl-2 proteininin yukarı regülasyonunu sağlamış ve bu durum, nöronlarda sağkalım oranlarının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Wu ve ark 2021).

Sonuç olarak, flavonoidlerin Bcl-2 üzerindeki etkileri çift yönlüdür: bazı bileşikler anti-apoptotik Bcl-2 proteinini baskılayarak hücre ölümünü kolaylaştırırken, bazıları ise bu proteini artırarak hücreyi koruma eğilimindedir. Bu durum, flavonoidlerin tedavi edici potansiyelinin hedef hücre ve hastalığa göre dikkatle değerlendirilmesini gerekli kılar (Kumar ve Pandey 2013).

1.9.6. Flavonoidlerin Bax Üzerine Etkileri

Flavonoidler, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde önemli düzenleyici roller üstlenen doğal bileşiklerdir (Panche ve ark 2016). Apoptotik sinyal yolları üzerindeki düzenleyici etkileri sayesinde, özellikle mitokondriyal yolak aracılığıyla programlanmış hücre ölümünü yönlendirdikleri bildirilmektedir. Bu etkiler, çoğunlukla Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeylerini modüle etmeleri yoluyla ortaya çıkmaktadır (Mahmoud ve ark 2019).

Carvacrol'ün MCF-7 hücrelerinde apoptotik süreci Bax ve p53 artışıyla güçlendirip, Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Moradipour ve ark 2022). Yüksek glukoz kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon modelinde morin uygulaması, Bax ekspresyonunun azalmasına ve mitokondriyal bütünlüğün korunmasına katkı sağlamış, böylece hücre ölümünün engellenmesine yardımcı olmuştur (Kapoor ve Kakkar 2012).

Quercetin'in, MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal apoptozu teşvik ederek Bax düzeylerini artırdığı ve Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Duo ve ark 2012). Benzer şekilde, apigenin'in A549 akciğer kanseri hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak Bax ekspresyonunu artırdığı, Bcl-2 düzeylerini düşürdüğü ve bu dengenin caspase-9 ile caspase-3 aktivasyonu yoluyla apoptozu başlattığı belirlenmiştir (Lu ve ark 2010).

I/Rhasarını takiben artan BAX seviyeleri chuju bitkisinin toplam flavonoid bileşenlerinin (TFCJ) etkisiyle bu durum tersine çevrilmiştir (Wang ve ark 2021).

Luteolin'in, HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğu, Bax ve kaspaz-3 protein düzeylerini artırırken, Bcl-2 seviyelerini azalttığı ve mitokondriyal yolla apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (Krifa ve ark 2014).

Hesperetin, mitokondriyal yolla apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerinde hücre ölümünü destekleyen önemli bir flavonoiddir. Yapılan bir çalışmada, hesperetin uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Bak ve Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aynı zamanda Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin seviyelerinde belirgin bir azalma rapor edilmiştir (Parhiz ve ark 2015). Fisetin, birçok meyve ve sebze bulunan doğal bir flavonoiddir ve güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser özellikler sergiler.

Yapılan çalışmalar, fisetinin insan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde proapoptotik Bak, Bax ve Bad proteinlerinin ekspresyonunu artırdığını; buna karşılık Bcl-

2 düzeylerini azalttığını ve mitokondriyal yolla apoptozu tetiklediğini göstermiştir (Li ve ark 2017). Jaceosidin, Artemisia argyi bitkisinden elde edilen doğal bir flavonoid olup, U87 glioblastoma hücrelerinde p53 ve Bax proteinlerinin ekspresyonunu artırarak mitokondriyal yolla apoptozu tetiklemiş; hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılamıştır (Khan ve ark 2012).

İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, mitokondriyal yoldan apoptozu aktive eden pro-apoptotik proteinlerin, özellikle de Bax'ın ekspresyonunun artışıyla karakterizedir. Bu süreçte flavonoidlerin Bax üzerindeki düzenleyici etkileri, onların nöro ve kardiyoprotektif potansiyelinin temel mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmektedir. Wistar sıçanlarında yapılan deneysel bir modelde, kaempferol uygulamasının Bax ve kaspaz-3 düzeylerini baskıladığı, buna karşılık anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Bu moleküler değişikliklerin, İ/R sonrası miyokard dokusunda apoptoz oranını düşürdüğü ve dokunun korunmasına katkı

sağladığı rapor edilmiştir (Verma ve ark 2024). Doğal bir flavonoid olan didymin yapılan çalışmalarda BAX ekspresyonunu önemli ölçüde düşürmüştür (Li ve ark 2022).

Benzer şekilde, doğal bir flavonoid olan mangiferinin uygulanması, kalp dokusunda oksidatif stresin azalması ile birlikte Bax ekspresyonunun baskılanmasına, aynı zamanda Bcl-2 proteininin artışına yol açmıştır. Bu etki mitokondriyal stabilitenin korunması ve kardiyomiyosit sağkalımının desteklenmesi açısından önem taşımaktadır (Verma ve ark 2024). *Dracocephalum moldavica* L. bitkisinden elde edilen total flavonoid ekstraktı (TFDM), İ/R hasarı modelinde Bax düzeylerini düşürerek, mitokondriyal yoldan apoptoz sürecini belirgin biçimde inhibe etmiştir. Ek olarak, Bcl-2 artışı ve kaspaz-3, -7 ve -9 aktivitelerinin azalması, bu flavonoid kompleksin anti-apoptotik etkisini pekiştirmiştir (Zeng ve ark 2018). Orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) ile oluşturulan serebral iskemi modelinde ise icarin ve icaritin adlı flavonoidlerin kullanımı, nöronlarda Bax ekspresyonunu azaltmış, Bcl-2 düzeylerini yükseltmiş ve TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı düzeyde düşürmüştür. Bu sonuçlar, bu bileşiklerin beyin dokusunda apoptotik süreci baskılayarak nöroprotektif etki sağladığını göstermektedir (Wu ve ark 2021).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu tarafından 28.06.2024 tarihinde 2024-41 nolu Etik onayı ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel işlemler ve cerrahi müdahaleler, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiş, biyokimyasal analizler ise Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Fizyoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada, her biri 10–12 haftalık, 300–400 gram ağırlığında, erkek Wistar-albino türünde toplam 28 sıçan kullanılmıştır. Deney süreci öncesinde hayvanlar, standart laboratuvar diyetiyle beslenmiş ve suya serbest erişim sağlanmıştır. Deney ortamı, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsünde sabitlenmiştir.

2.1. Hayvan Grupları

Toplam 28 adet Wistar-albino türü erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen araştırmada gruplar şu şekilde oluşturuldu.

1-Kontrol Grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir anestezi ve cerrahi işlem uygulanmamıştır.

2-Sham Grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlarda genel anestezi oluşturulduktan sonra karotid arter bölgeleri açılıp kapatılmıştır. Uygulama sonrası 1 hafta süreli çözücü uygulaması yapılmıştır (1 ml DiOHF çözücüsü).

3-İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=8): Genel anestezi altında sıçanlarda karotid arterler izole edildikten sonra 30 dakika süreyle ligate edilerek iskemi yapılmıştır, takibinde reperfüzyon gerçekleştirilmiştir.

4-İskemi-Reperfüzyon + DiOHF Grubu (n=8): Genel anestezi altında sıçanlarda karotid arterler 30 dakika ligasyonla iskemi yapıldıktan sonra reperfüzyona izin verilmiştir. 1 hafta süre ile DiOHF takviyesi yapılmıştır.

2.2. Hayvanlar Üzerindeki Prosedürler

Grup 2, 3, 4'ü oluşturan hayvanlar Ketamin HCl 60mg/kg ve Xylazine HCl 5mg/kg karışımı periton içi uygulanarak genel anesteziyi takiben boyun orta hat ventral insizyonu ile sağ ve sol karotid arter; vagus siniri ve çevre dokulardan dikkatli bir şekilde izole edilmiştir. Grup 2'de sham operasyonu ve çözücü takviyesi (1 mlfindık yağı ve %10 DMSO) (1 hafta), grup 3 de ise yine I/R takiben çözücü (1 mlfindık yağı ve %10 DMSO) uygulaması yapılmıştır (1 hafta). Grup 3 ve 4'de karotid arterler ligate edilerek 30 dk süren fokal geçici serebral iskemi ve takiben reperfüzyon oluşturulmuştur. 4. Gruptaki hayvanlara reperfüzyonu takiben 1 hafta süreli 10 mg/kg dozunda DiOHF periton içi verilmiştir. Deneylerin bitiminde hayvanlar genel anestezi altında kalplerinden kan alındıktan sonra servikal dislokasyonla öldürülerek serebellum dokuları alınmıştır. Bu çalışmada serebellum dokusunda GRP78, Hsp70, Bax, Bcl2, Ddit3, Gapdh gen ifade seviyelerine bakılmıştır.

2.3. Real-Time qPCR Analizi

Serebellumdan RNA İzolasyonu

Real-Time qPCR analizi ile DCX ve BDNF genlerinin ifade belirlemek için önce ticari bir kit (Bio Basic; Kanada) kullanılarak total RNA izole edildi.

Serebellum dokuları tartıldı, her dokudan 25-50 mg örnek alındı ve bir homojenizatör (SONOPULSmini20, BANDELIN; Almanya) kullanılarak buz üzerinde 1 ml lizis tampon (miRNAExtractor) eklenerek parçalandı. Homojenize edilen örnekler 5-10 dakika oda sıcaklığında tamamen parçalanmalarından emin olmak için bekletildi ve tamamen parçalanmayan örnekler tekrar homojenize edildi. Daha sonra homojen hale getirilmiş örnekler 0.2 ml (200 µl) kloroform ilave edildi ve 30 saniye vorteks yapıldı. Devamında örnekler kit kılavuzunda belirtildiği gibi 12000xg'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjleme ile örnekler üç faza, bir alt organik faza, denatüre proteinler ve gDNA içeren bir orta faza ve RNA içeren bir üst sulu faza ayrıldı. Üst RNA içeren faz toplandıktan sonra temiz bir RNaz içermeyen 1,5

ml hacminde santrifüj tüpüne aktarıldı. 1,5 hacim %100 etanol eklendikten sonra ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Elde edilen karışım kit içerisinde bulunan Spin Kolonuna aktarıldı ve 12000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra Spin kolona 0,5 ml RPE solüsyonu eklendi ve tekrar 12000xg'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu adım birkaç kez tekrarlandıktan sonra kolon yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi, üzerine 50 µl RNaz içermeyen su ilave edildi ve 2 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Daha sonra 12000xg'de 30 saniye santrifüj edildi.

Sonucunda oluşan RNA'ların saflığını ve miktarını belirlemek hedefiyle Nanodrop (SMA 1000, Merinton, Çin) kullanıldı. Optik yoğunluklarına (OD260/280) göre OD260/280 oranı hesaplandı. 1,9'un üzerinde değerlere sahip RNA'lar çalışmada kullanıldı. Elde edilen total RNA'lar -20°C'de cDNA sentezinde kullanılması amacıyla saklandı.

cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'daki mRNA, ticari kit (OneScript Plus, ABM; Kanada) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Her örnekten eşit miktarda RNA alındı ve üretici firma tarafından önerilen protokole açıklanan adımlar sırayla uygulandı. Tablo 2.3'te belirtildiği gibi cDNA sentez karışımı elde edildi. Ardından, bu karışımdan 10 µl alınıp, 10 µl RNA örnekleri üzerine ilave edildi.

Her bir tüp dikkatlice karıştırıldıktan sonra Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) cihazı ile kitte belirtilen protokol ile revers transkripsiyon programı çalıştırıldı. Bu program öncelikle 55°C'de 15 dakika cDNA sentezi ve ardından 85°C'de 5 dakika denatürasyon ve +4°C'de bekleme basamağını içermektedir. Elde edilen cDNA miktarı ve saflığını belirlemek için nanodrop (SMA 1000, Merinton, China) kullanıldı ve örnekler qPCR gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklandı

GRP78, HSP70, CHOP, BAX ve BCL2 Genlerinin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Real-Time qPCR reaksiyonları hazırlanırken standart eğriler çizmek için 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 dilüsyon oranları, herhangi bir müdahaleye tabi tutulmamış hayvanların (kontrol grubu) serebellum dokularından elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak hazırlandı.

Ayrıca primerlerin uygun sıcaklıkta bağlanabilmesi için sıcaklık aralıkları test edilerek standardizasyon yapıldı. Hedef gen ifadesinin mRNA düzeyinde analizi için kullanılan primerler, üretici firmadan (Sentebiolab, Türkiye) temin edildi (tablo 2.4).

Oligomer (Türkiye) firması tarafından sentezlenen GAPDH, referans geni olarak kullanıldı. Çalışmada her reaksiyonda yaklaşık 50 ng primer kullanıldı (Tablo 2.3)

Tablo 2.3. Real Time PCR için kullanılan primerler.

Gen	Primer dizisi	Fonksiyonu
GRP78 İleri	5'-GGATAAGAGAGAGGGAGAGAAGA-3'	Hedef gen
GRP78 Geri	5'-CCCAGATGAGTGTCTCCATTAG-3'	Hedef gen
BAX İleri	5'-TTTGCTACAGGGTTTCATCCA-3'	Hedef gen
BAXGeri	5'-TCCACATCAGCAATCATCCTC-3'	Hedef gen
BCL2 İleri	5'-CAAGAATGCAAGCACATCCA-3'	Hedef gen
BCL2 Geri	5'-CACGATCTCCCGGTTATCATAC-3'	Hedef gen
HSP70 İleri	5'-CTTCGTGGAGGAGGTTCAAGAG-3'	Hedef gen
HSP70 Geri	5'-GCGTGATGGACGTGTAGAA-3'	Hedef gen
CHOP İleri	5'-CTCCAGATTCCAGTCAGAGTTC-3'	Hedef gen
CHOP Geri	5'TGCCACTTTCCTCTCATTCTC-3'	Hedef gen
GAPDH İleri	5'-GGGCCAAAAGGGTCATCATC-3'	Referans gen
GAPDH Geri	5'-AACCTGGTCCTCAGTGTAGC-3'	Referans gen

PCR reaksiyonları için hazır ticari kit (BlaSTaq 2X qPCR Master Mix, ABM, Kanada) kullanıldı. Reaksiyonlar toplamı 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği aşağıdaki tabloda açıklandığı gibi hazırlandı.

Bileşim	Miktar
Master Mix (Enzyme, dNTP, Mg, buffer and water)	10 µl
cDNA	5 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3 µl

PCR koşulları primerlerin optimizasyonu sonrasında şu şekilde ayarlandı. 95°C'de 3 dakika enzim aktivasyonu, denatürasyon 95°C'de 10 saniye, bağlanma ve polimerizasyon 60°C'de 1 dakika, döngü sayısı 40 olarak ayarlandı. Tüm reaksiyonlar, CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen 2- $\Delta\Delta$ CT yöntemi kullanılarak qPCR analizi sonuçları değerlendirildi.

2.4. İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası karşılaştırma için KruskalWallis varyans analizi kullanıldı ve $p < 0,05$ seviyesi için Mann-Whitney U-testi uygulandı. $P < 0,05$ seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

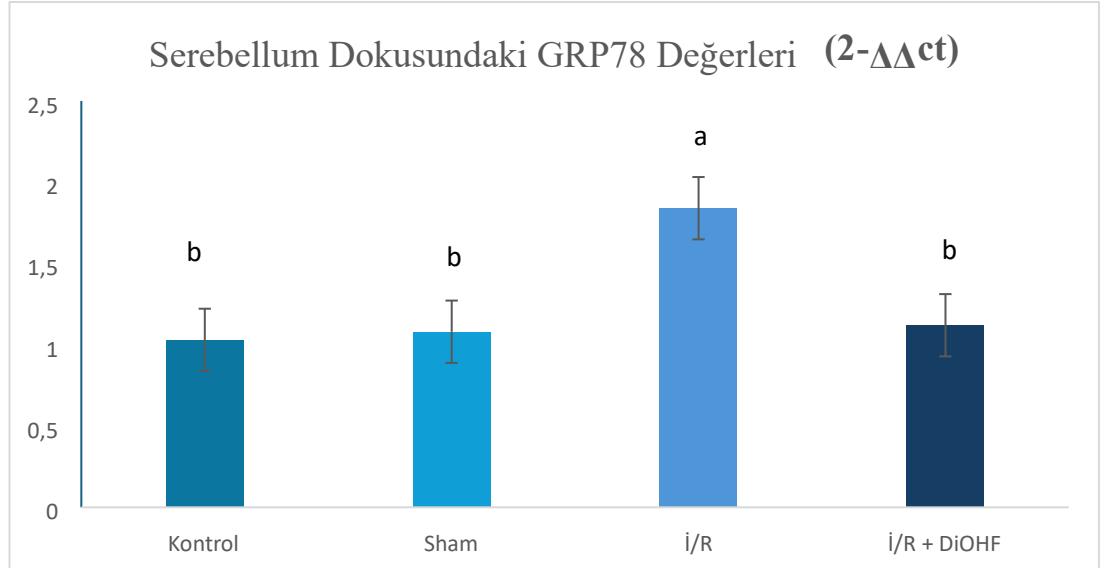
3. BULGULAR

Araştırma gruplarına ait serebellum GRP78 değerleri tablo 3.1 ve Grafik 3.1’de verilmiştir. Mevcut çalışmada serebellum GRP78 seviyeleri incelendiğinde İ/R grubunda ölçülen parametre anlamlı şekilde artarken, DiOHF uygulaması bu artışı baskılayarak seviyeleri kontrol grubuna yakınlaştırmış ve potansiyel nöroprotektif etkisini ortaya koymuştur.

Tablo 3.1. Serebellum dokusunda GRP78 değerleri

Grup	N	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	6	1.03 ± 0.28b
Sham	6	1.08 ± 0.30b
İ/R	8	1.84 ± 0.84a
İ/R + DiOHF	8	1.12 ± 1.03b

Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,05$).



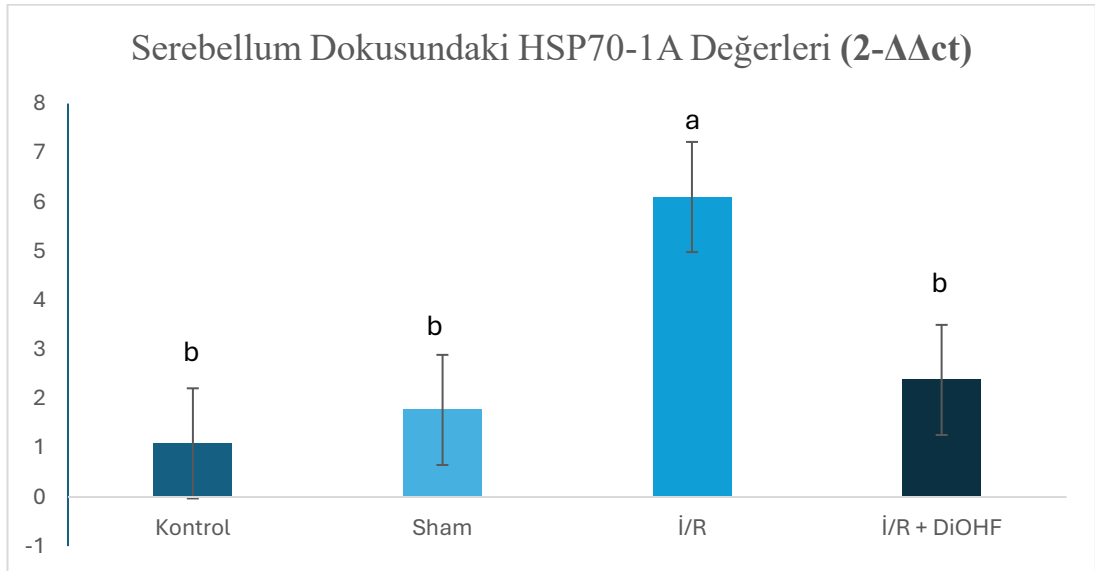
Grafik 3.1. Serebellum dokusunda GRP78 değerleri. GRP78 düzeyleri İ/R grubunda artarken DiOHF uygulaması bu artışı tersine çevirerek GRP78 ekspresyonunda düşüş sağlamıştır.

Serebellum HSP70-1A° değerleri tablo 3.2 ve grafik 3.2’de sunulmuştur. Deney grupları arasında karşılaştırma yapıldığında ilgili dokudaki HSP70 seviyeleri İ/R ile artarken, sonrasında DiOHF uygulaması artmış olan bu parametreyi tekrar düşürmüştür (P<0.05).

Tablo 3.2. Serebellum dokusunda HSP70-1A değerleri

Grup	N	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	6	1.09 ± 0.28b
Sham	6	1.77 ± 0.71b
İ/R	8	6.10 ± 0.59a
İ/R + DiOHF	8	2.38 ± 0.31b

Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0,05).



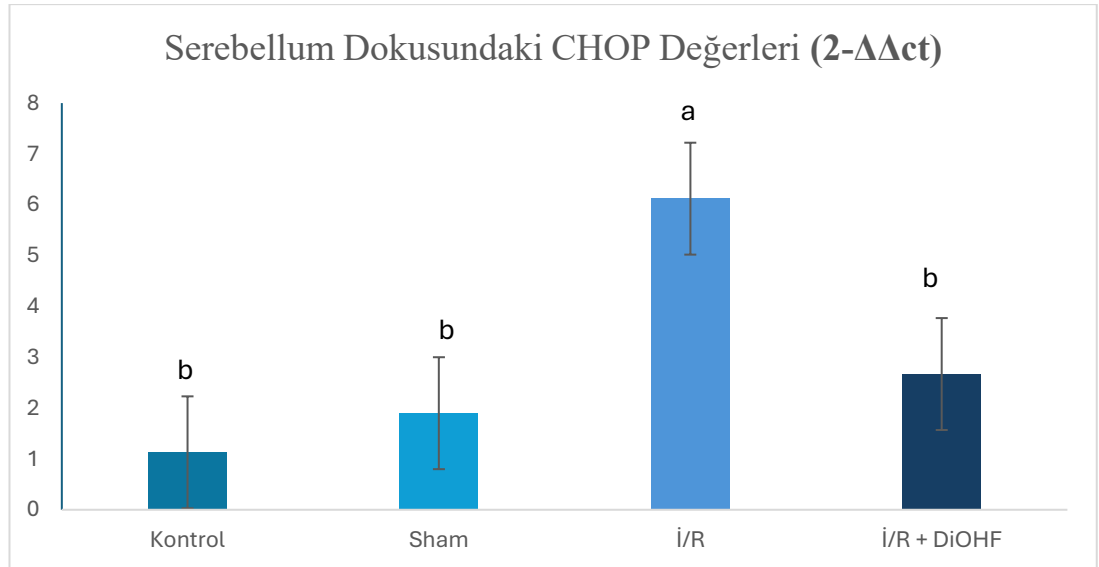
Grafik 3.2. Serebellumda HSP70-1A değerleri., iskemik-reperfüzyon (İ/R) grubunda artmış olup, DiOHF uygulaması bu artışı kısmen geri döndürerek HSP70 ekspresyonunda düşüş sağlamıştır.

Serebellum CHOP değerleri tablo 3.3 ve grafik 3.3’de sunulmuştur. Deney grupları arasında karşılaştırma yapıldığında ilgili dokudaki CHOP seviyeleri İ/R ile artarken, sonrasında DiOHF uygulaması artmış olan bu parametreyi tekrar azaltmıştır. (P<0.05)

Tablo 3.3 Serebellum dokusunda CHOP değerleri

Grup	N	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	6	1.13 ± 0.57b
Sham	6	1.90 ± 0.21b
İ/R	8	6.10 ± 1.56a
İ/R + DiOHF	8	2.68 ± 0.89b

Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0,05).



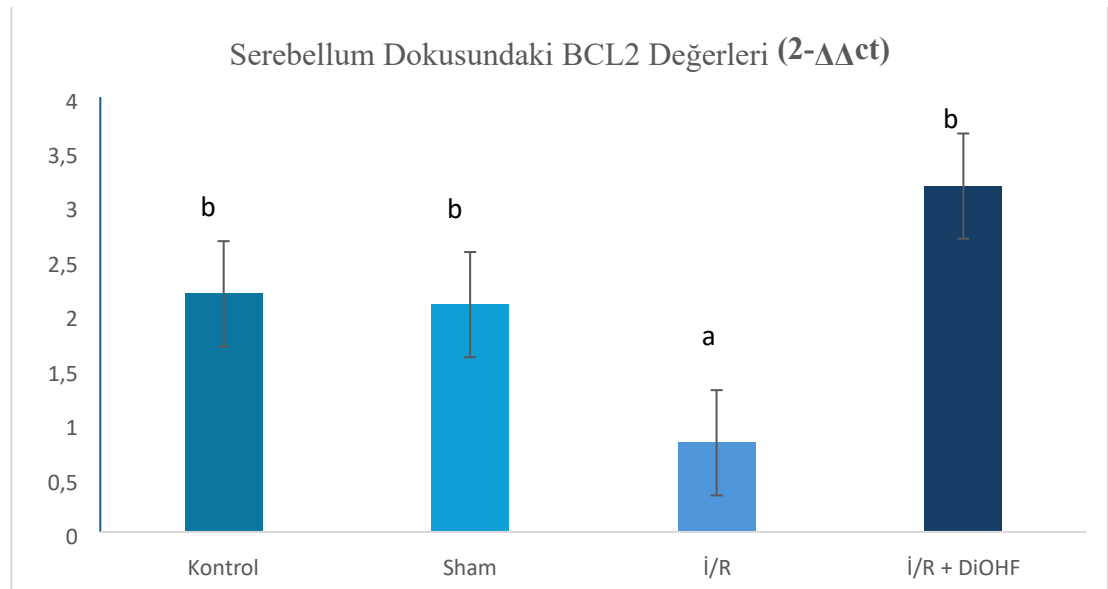
Grafik 3.3. Serebellumda CHOP değerleri. CHOP düzeyleri, İ/R grubunda belirgin şekilde artmış olup, DiOHF uygulaması bu artışı azaltarak CHOP ekspresyonunda düşüş sağlamıştır.

Serebellum dokusundaki BCL-2 deęerleri Tablo 3.4 ve Grafik 3.4’de verilmiřtir. İ/R grubunda BCL-2 düzeyi anlamlı řekilde dūřerken, DiOHF uygulaması bu dūřüřü tersine çevirmiřtir. Kontrol ve sham gruplarında benzer BCL-2 seviyeleri gözlenirken, İ/R grubunda belirgin bir azalma izlenmiř; İ/R + DiOHF grubunda ise BCL-2 düzeyi hem kontrol grubuna hem de İ/R grubuna göre artış göstermiřtir. Bu bulgu, DiOHF’nin anti-apoptotik BCL-2 proteini üzerindeki düzenleyici etkisini desteklemektedir.

Tablo 3.4. Serebellum dokusunda BCL-2 değerleri

Grup	N	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	6	2.19 \pm 0.76b
Sham	6	2.09 \pm 0.31b
İ/R	8	0.82 \pm 0.29a
İ/R + DiOHF	8	3.18 \pm 0.33b

Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).



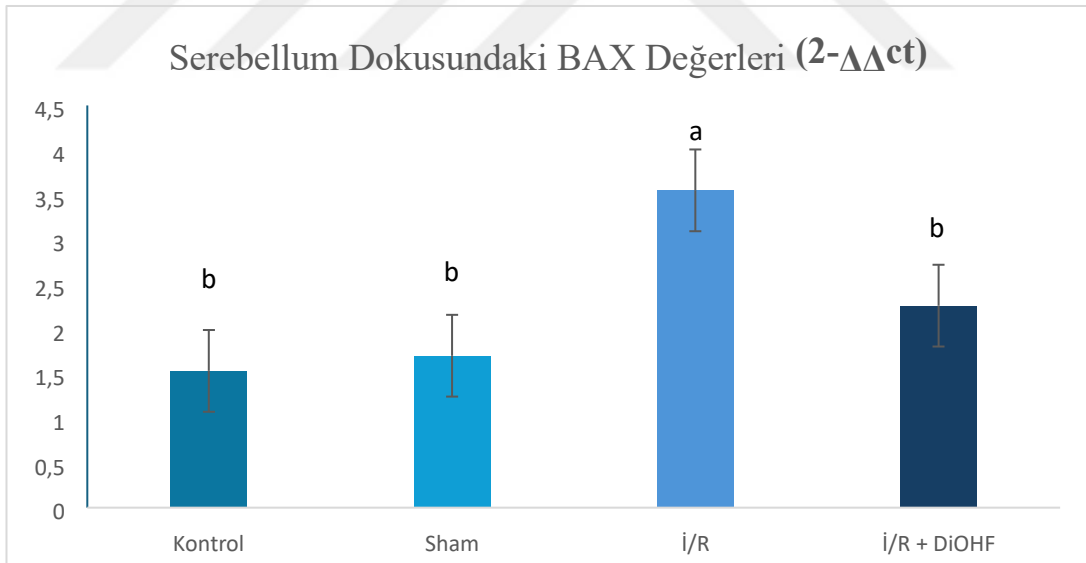
Grafik 3.4. Serebellum dokusundaki BCL-2 değerleri. BCL-2 düzeyleri İ/R grubunda belirgin şekilde azalırken, DiOHF uygulaması bu azalmayı tersine çevirerek BCL-2 ekspresyonunda anlamlı bir artış sağlamıştır.

Araştırma gruplarına ait serebellum dokusundaki BAX değerleri tablo 3.5 ve grafik 3.5 de gösterilmiştir. İ/R grubunda BAX ekspresyonu anlamlı derecede artarken, DİOHF uygulaması bu artışı belirgin şekilde azaltmıştır. Bu bulgu, DİOHF'nin apoptotik süreç üzerindeki düzenleyici etkisini desteklemektedir.

Tablo 3.5. Serebellum dokusunda BAX değerleri

Grup	N	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	6	1.53 ± 0.29b
Sham	6	1.70 ± 0.39b
İ/R	8	3.55 ± 0.66a
İ/R + DiOHF	8	2.26 ± 0.80b

Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).



Grafik 3.5. Serebellum dokusundaki BAX değerleri. İ/R grubunda Bax düzeyleri anlamlı şekilde artarken, DiOHF uygulaması bu artışı belirgin biçimde azaltmıştır.

4. TARTIŞMA

Gerçekleştirilmiş olan çalışmanın bulgularına bakıldığında sıçanlarda fokal beyin İ/R ile endoplazmik retikulum stresinde önemli göstergelerden olan GRP78, HSP70 ve CHP gibi moleküllerde belirgin artışların olduğu görülmektedir. Aynı zamanda İ/R sonrası 1 hafta süreli DiOHF takviyesi ile artmış olan parametrelerde belirgin azalmalar tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca apoptotic yollarda önemli moleküller olan Bcl-2 ve Bax parametreleri de değerlendirildi. Bax İ/R ile artarken, Bcl2 seviyeleri baskılandı. Ancak DiOHF uygulaması değişmiş olan apoptotik parametreleri düzeltti.

Araştırmada ilk olarak endoplazmik retikulum stresiyile ilişkili olarak GRP78 seviyeleri değerlendirildi. Bu parametre beyin İ/R'sine bağlı olarak serebellum dokusunda önemli bir artış göstermiş olmasına rağmen 1 haftalık DiOHF uygulaması değişen GRP 78 seviyelerini düzeltmiştir. Endoplazmik retikulum (ER), protein katlanması, kalsiyum dengesi ve lipid biyosentezi gibi hayati hücresel işlevlerin gerçekleştiği bir organeldir. Bu işlevlerin bozulması durumunda, hücre 'Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)' isimli adaptif yanıt mekanizmasını devreye alarak hayatta kalmaya çalışır. GRP78, UPR'in merkezi regülatörlerinden biri olup aynı zamanda ER stresine karşı erken dönemde artış gösteren önemli bir biyobelirteçdir (Lee 2005).

Flavonoidler, hücresel işlevleri modüle etme ve çeşitli hastalık süreçlerini iyileştirme potansiyeline sahip doğal bileşiklerdir. Bu bileşiklerin, özellikle endoplazmik retikulum (ER) stresine karşı hücrelerin adaptif yanıtlarını düzenleme yeteneği öne çıkmaktadır. GRP78 (Glukoz-Regüle Edilen Protein 78), ER stresine karşı hücresel bir savunma mekanizmasının anahtar düzenleyicisidir. Bir flavonoid olan luteolin, insan kolon kanseri hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini baskılayarak GRP78 düzeylerini anlamlı şekilde azaltmıştır. GRP78 seviyelerindeki düşüş, CHOP ve kaspaze-12 ekspresyonunun da azalmasına neden olmuş ve bu sayede hücresel sağkalım artmıştır (Omar ve ark 2016). Quercetin, flavonol sınıfına ait bir flavonoid olup, ER stresini azaltarak GRP78 ekspresyonunu düşürebilir. Bir çalışmada, quercetin'in GRP78, GADD153 ve sitozolik sitokrom C düzeylerini düşürdüğü

bildirilmiştir. Bu etki, quercetin'in antioksidan özellikleri ve ER stresini doğrudan modüle etme kapasitesiyle ilişkilidir (Keylani ve ark 2022). Bununla birlikte bazı flavonoidlerin GRP78'i artırıcı etkiler gösterebildiği de bildirilmektedir. Naringenin, yüksek glukozla indüklenen insan endotel hücrelerinde GRP78 ekspresyonunu artırarak hücrel stresle başa çıkma kapasitesini güçlendirmiştir. Bu bulgu, flavonoidlerin etkisinin hücrel bağlamın koşullarına göre değişebileceğini göstermektedir. GRP78'in yükselmesi bazı durumlarda hücrede hasar değil, aksine homeostazın sağlanmasına yardımcı olabilir (Yan ve ark 2023). Ayrıca, üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi (GSP) gibi polifenolik bileşikler, GRP78 ve CHOP gibi stres belirteçlerinin baskılanmasında etkili bulunmuştur. Fu ve ark. nın (2019) çalışmasında ise GSP tedavisi, nöronal hücrelerde ER stres kaynaklı apoptozun azaltılması yoluyla hücre kaybının önlenmesinde etkili bulunmuştur. Bu durum, flavonoidlerin hem ER stresine karşı savunma sağladığını hem de nörodejeneratif süreçlerde terapötik potansiyel taşıdığını göstermektedir (Fu ve ark 2019). Baicalein'in hepatoselüler karsinom hücrelerinde uygulandığı çalışmalarda, endoplazmik retikulum stresi aracılığıyla hem apoptoz hem de otofajinin uyarıldığı, bu süreçte GRP78 düzeylerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark 2014).

Üzüm çekirdeği ekstresi, sisplatin kaynaklı nefrotoksisite modelinde GRP78 ve kaspaz-12 düzeylerini düşürerek ER stresine bağlı apoptotik süreci sınırlamıştır (Gao ve ark 2014). Gerçekleştirmiş olduğumuz araştırmada ise sentetik bir flavonoid olan 3',4'-dihydroxyflavonol'un deneysel beyin iskemi reperfüzyonunda serebellum dokusundaki GRP78 düzeylerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Tedavi amacıyla kullanılan 3',4'-dihydroxyflavonol daha önce herhangi bir araştırmada endoplazmik retikulum stresine olan etkisi incelenmemiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen bu veriler DiOHF'nin potansiyel İ/R durumlarında tedavi amacıyla kullanımının GRP78 seviyelerini baskılamak suretiyle potansiyel olarak endoplazmik retikulum stresine karşı koruyucu etki sağlamakla daha önce farklı çalışmalardan elde edilen ve değişik flavonoidlerin tedavi edici etkisini destekler mahiyettedir. Özellikle 3',4'-dihydroxyflavonoid yapısına sahip flavonoidlerin, Nrf2/ARE yolunu aktive ederek hücre içi redoks dengesini koruyan endojen antioksidanların ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Xu ve ark 2022). Bu flavonoid alt grubuna dâhil olan quercetin,

luteolin ve kaempferol gibi moleküller, nöroprotektif etkileri ile de dikkat çekmektedir (Spencer 2008). Bu grup içinde yer alan DiOHF, hem B halkasındaki 3',4' hidroksil grupları hem de flavonollerin karakteristik 3-hidroksil yapısını içerir. Bu yapısal bütünlük, DiOHF'e güçlü bir antioksidan etki sağlamanın yanında, metal iyonlarını bağlama yeteneği de kazandırır (Williams ve ark 2004).

Çalışmada değerlendirilen bir diğer parametre de HSP70'dir. HSP 70, hücre içi protein homeostazını korumada kritik rol oynayan bir moleküler şaperondur; proteinlerin katlanmasına yardımcı olur, agregasyonu önler ve stres koşullarında yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasını veya yıkımını destekler (Daugaard ve ark 2007). Hsp70, iskemik hasar gibi stresli durumlarda hücrelerin korunmasında kritik bir rol oynar (Shao ve ark 2019). Baicalin'in, global serebral iskemi-reperfüzyon modelinde HSP70 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Dai ve ark 2013). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksijenin (O₂) varlığı, HSP70 gibi sinyal yollarının etkili şekilde engellenmesiyle STAT3'ün artan ifadesi, cisplatin ile tedavi edilen sıçanlarda makrofajların anti-inflamatuar tip 2 fenotipe dönüşmesini sağlayarak böbrekteki oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümünü önemli ölçüde azaltmıştır (Saad ve ark 2024). Silymarin'in mezenterik iskemi-reperfüzyon modelinde HSP70 düzeylerini yükselterek doku üzerindeki oksidatif stres yükünü azalttığı ve hücrel stres yanıtını modüle ettiği rapor edilmiştir (Demir ve ark 2014). Kırmızı şarapta bulunan polifenolik bileşiklerin, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında HSP70 ekspresyonunu teşvik ederek kardiyomiyositleri oksidatif hasardan koruduğu belirlenmiştir (Sato ve ark 2002). HSP70, hücre içi proteinlerin katlanmasını düzenlemenin yanı sıra, apoptoz mekanizmalarını baskılayarak hücre sağkalımını artırır. Bu nedenle, flavonoidlerin HSP70 seviyelerini azaltması, özellikle kanser tedavisinde faydalı bir strateji olabilir. Örneğin hesperetin, akciğer kanseri hücrelerinde HSP70 proteinini baskılayarak mitokondriyel apoptoz yolunu aktive etmiş, böylece hücre ölümünü desteklemiştir (Tanaka ve ark 2022). Buna karşılık, naringenin gibi bazı flavonoidler ise endotel hücrelerinde HSP70 düzeylerini artırarak yüksek glukoz kaynaklı oksidatif hasarı azaltmış ve hücreleri koruyucu bir etki göstermiştir (Zhang ve ark 2022). HSP70 proteini, miyokardiyal iskemi sonrasında kardiyomiyositlerin hayatta kalmasını destekleyerek oksidatif stresi azaltır.

Flavonoidlerin ise HSP70 ekspresyonunu artırarak bu koruyucu süreci modüle ettiği prelinik modellerde gsterilmiştir (Zhao ve ark 2007). Flavonoidler, iskemireperfüzyon kaynaklı hücrel stres durumlarında HSP70'in indüksiyonunu artırarak protein katlanma sürecini destekler, mitokondriyal fonksiyonu korur ve apoptozu baskılar; bu mekanizma, bu bileşiklerin potansiyel terapötik etkilerini açıklamada önemlidir. Mevcut çalışmada ise İ/R ile değişen HSP 70 düzeyleri DiOHF takviyesi kontrol değerlerine yaklaşmıştır. Çalışmada kullanılan sentetik flavonoid DiOHF'nin düzenleyici bir işlev yapmak suretiyle beyin iskemi reperfüzyonunda serebellum dokusundaki endoplazmik retikulum stresine karşı koruyucu bir etki sağladığı görölmektedir.

Araştırmamızda ayrıca endoplazmik stress cevabına karşı düzenleyici bir molekül olarak CHOP proteinindeki değişimler incelendi. Bu protein İ/R ile birlikte artış gösterirken DiOHF tedavisi ile baskılandı. CHOP (C/EBP homologous protein), ER stres yanıtı sürecinde yer alan ve özellikle uzun süreli stres koşullarında apoptoz mekanizmalarını devreye sokan temel transkripsiyon faktörlerinden birisi olarak ön plana çıkmaktadır. PERK-eIF2 α -ATF4 yolları üzerinden aktive edilen CHOP, protein katlanma bozuklukları durumunda proapoptotik genlerin ifadesini artırarak hücre ölümüne neden olduğu daha önceki bir çalışmada rapor edilmiştir (Oyadomari ve Mori 2004).

Gerçekleştirilmiş olan bir deneysel çalışmada bir flavonoid türü olan Naringenin tedavisinin, deneysel travmatik beyin hasarı modelinde CHOP düzeylerini azaltarak ER stresini hafiflettiği gösterilmiştir (Deng ve ark 2021). Kaempferol uygulamasının, d-GalN/LPS ile oluşturulan akut karaciğer yetmezliği modelinde CHOP ekspresyonunu azaltarak ER stres kaynaklı hücre ölümünü sınırladığı ve GRP78 seviyelerini artırdığı rapor edilmişti (Wang ve ark 2019). Scutellaria baicalensis bitkisinden elde edilen baicalein, oksidatif hasarı azaltarak ve hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaları etkileyerek nöroprotektif faydalar sağlamaktadır. Özellikle CHOP ekspresyonunun inhibisyonu, baicalein'in anti-apoptotik etkilerinin temel mekanizmalarından biridir. Baicalein uygulanan spinal kord İ/R modeli farelerde, CHOP düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı ve bunun apoptotik süreci

baskıladığı gözlemlenmiştir (Wu ve ark 2020). Üzüm çekirdeği proantosiyanidinleri (GSP) gibi polifenolik yapıda flavonoidler de CHOP düzeylerini azaltarak endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptozu baskılamış ve nöronlarda önemli bir koruma sağlamıştır. Bu etkinin, flavonoidlerin ER şaperon proteinleri ve oksidatif stresle ilişkili sinyal yollarını modüle edici özellikleri ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Fu ve ark 2019).

3',4'-Dihidroksiflavonol (DiOHF), tunikamisin ile oluşturulan endoplazmik retikulum stresine karşı insan endotel hücrelerinde koruyucu etki göstermiş olup; bu etki CHOP ve GRP78 gibi stresle ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerini azaltarak apoptozun engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Lau ve ark 2018). CHOP'un hücre ölüm yollarındaki temel rolü, onu hedefleyen biyolojik müdahaleleri terapötik açıdan önemli hale getirmektedir. Flavonoid türevleri, bu bağlamda CHOP ekspresyonunu baskılayarak endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptozu azaltabilmekte ve iskemik beyin hasarı gibi durumlarda nöroprotektif potansiyel göstermektedir (Choi ve ark 2010, Fu ve ark 2019). Bizim araştırmamızda ise deneysel fokal beyin iskemireperfüzyonunda 1 hafta süreli DiOHF kullanımı ile CHOP düzeylerinde azalma tespit edilmiş olması yukarıda belirtilmiş olan çalışmalara benzerlik göstermektedir.

Çalışmanın son bölümünde apoptotik süreçleri değerlendirmek için Bax ve Bcl-2 proteinlerinin serebellum dokusudaki değişimleri incelendi. Bcl-2 proteini, mitokondriyal zarın bütünlüğünü koruyarak hücre ölüm sinyallerini engelleyen önemli bir anti-apoptotik faktördür (Youle ve Strasser 2008). Bizim araştırmamızda da beyin İ/R'sine bağlı olarak bu protein düzeyinde önemli bir azalma olurken, DiOHF tedavisi azalmış olan Bcl-2 seviyelerinde önemli bir artışa yol açmıştır. Bu protein, özellikle sitokrom C salınımını önleyerek kaspaz kaskadının aktive olmasını engeller ve hücre sağkalımını destekler (Cory ve Adams 2002).

Flavonoidlerin sinyal yolları üzerindeki etkisi, hücre ortamının durumuna göre değişiklik gösterebilir. Özellikle PI3K/Akt yolunun aktivasyonu Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücre sağkalımını desteklerken; bu yolun inhibisyonu, Bcl-2 düzeylerinde azalmaya ve apoptozun hızlanmasına yol açabilir (Datta ve ark 1997), (Song ve ark 2005). Sıçanlarda yapılan bir deneysel serebral İ/R modelinde,

kaempferol uygulamasının Bcl-2 düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı, buna karşın Bax ve caspase-3 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu değişiklikler, iskemik alanda apoptotik hücre sayısının azalmasına katkıda bulunmuştur (Verma ve ark 2024). Quercetin'in apoptotik mekanizmalar üzerindeki etkileri, özellikle Bcl-2 ailesi proteinlerinin regülasyonu yoluyla belirgin hale gelmektedir. Niu ve ark. (2011), HL-60 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, quercetin'in Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını ve aynı zamanda pro-apoptotik Bax protein düzeyini artırarak hücre ölümünü indüklediğini bildirmiştir (Niu ve ark 2011). Benzer şekilde, fisetin adlı flavonoid, insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini baskılamış ve buna karşılık proapoptotik faktör olan kaspaz-3 aktivitesini artırmıştır (Khan ve ark 2008). Buna karşılık bazı flavonoidler, özellikle oksidatif stres veya iskemik koşullar altındaki hücre modellerinde, Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücreyi koruyucu etki göstermektedir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidinleri (GSP), oksijen-glikoz yoksunluğu/reoksijenasyon (OGD/R) uygulanan N2a hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini artırmış ve apoptotik belirteçleri baskılamıştır (Fu ve ark 2019). İcariin ve türevi icaritin, orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) modeliyle oluşturulan iskemik beyin hasarında Bcl-2 proteininin yukarı regülasyonunu sağlamış ve bu durum, nöronlarda sağkalım oranlarının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Wu ve ark 2021).

Sonuç olarak, flavonoidlerin Bcl-2 üzerindeki etkileri çift yönlüdür: bazı bileşikler anti-apoptotik Bcl-2 proteinini baskılayarak hücre ölümünü kolaylaştırırken, bazıları ise bu proteini artırarak hücreyi koruma eğilimindedir. Bu durum, flavonoidlerin tedavi edici potansiyelinin hedef hücre ve hastalığa göre dikkatle değerlendirilmesini gerekli kılar (Kumar ve Pandey 2013).

Özellikle 3',4'-dihydroxyflavonoid yapısına sahip flavonoidlerin, Nrf2/ARE yolunu aktive ederek hücre içi redoks dengesini koruyan endojen antioksidanların ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Xu ve ark 2022). Bu flavonoid alt grubuna dâhil olan quercetin, luteolin ve kaempferol gibi moleküller, nöroprotektif etkileri ile de dikkat çekmektedir (Spencer 2008). Bu grup içinde yer alan DiOHF, hem B halkasındaki 3',4' hidroksil grupları hem de flavonollerin karakteristik 3-hidroksil

yapısını içerir. Bu yapısal bütünlük, DiOHF'e güçlü bir antioksidan etki sağlamanın yanında, metal iyonlarını bağlama yeteneği de kazandırır (Williams ve ark 2004).

Hayvan deneyleri, DiOHF tedavisinin İ/R hasarı sonrası nöronlarda apoptoz oranını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Cetin ve ark 2025). Yakın zamanda yapılan deneysel çalışmalarda, 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF)'ün serebral iskemireperfüzyon modeli gibi oksidatif stresin yoğun olduğu durumlarda hücre içi dengeyi koruduğu ve apoptoz oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Dasdelen ve ark 2024). Ancak bahse konu çalışmada DiOHF kaspazlar üzerinden antiapoptotik aktivite göstermiştir. Bu çalışmada ise genellikle antiaoptotik bir protein olarak değerlendirilen Bcl-2 üzerinden antiapoptotik aktivite göstermiştir olması belirtilen çalışmayı desteklemektedir. Flavonoidler, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde önemli düzenleyici roller üstlenen doğal bileşiklerdir (Panche ve ark 2016). Apoptotik sinyal yolları üzerindeki düzenleyici etkileri sayesinde, özellikle mitokondriyal yolak aracılığıyla programlanmış hücre ölümünü yönlendirdikleri bildirilmektedir. Bu etkiler, çoğunlukla Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeylerini modüle etmeleri yoluyla ortaya çıkmaktadır (Mahmoud ve ark 2019).

Carvacrol'ün MCF-7 hücrelerinde apoptotik süreci Bax ve p53 artışıyla güçlendirip, Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Moradipour ve ark 2022). Chrysin'in hepatoselüler karsinom hücrelerinde p53, Bax, Bak ve Bad proteinlerinin seviyelerini artırdığı; buna karşılık Bcl-2 ekspresyonunu düşürdüğü ve böylece p53/Bcl-2/caspase-9 sinyal eksenini aktive ederek hücre ölümünü teşvik ettiği rapor edilmiştir. Luteolin'in, HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğu, Bax ve kaspaz-3 protein düzeylerini artırırken, Bcl-2 seviyelerini azalttığı ve mitokondriyal yolla apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (Krifa ve ark 2014). İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, mitokondriyal yoldan apoptozu aktive eden pro-apoptotik proteinlerin, özellikle de Bax'ın ekspresyonunun artışıyla karakterizedir. Bu süreçte flavonoidlerin Bax üzerindeki düzenleyici etkileri, onların nöro ve kardiyoprotektif potansiyelinin temel mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmektedir. Wistar sıçanlarında yapılan deneysel bir modelde, kaempferol

uygulamasının Bax ve kaspaz-3 düzeylerini baskıladığı, buna karşılık anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Bu moleküler değişikliklerin, İ/R sonrası miyokard dokusunda apoptoz oranını düşürdüğü ve dokunun korunmasına katkı sağladığı rapor edilmiştir (Verma ve ark 2024).

Benzer şekilde, doğal bir flavonoid olan mangiferinin uygulanması, kalp dokusunda oksidatif stresin azalması ile birlikte Bax ekspresyonunun baskılanmasına, aynı zamanda Bcl-2 proteininin artışına yol açmıştır. Bu etki mitokondriyal stabilitenin korunması ve kardiyomiyosit sağkalımının desteklenmesi açısından önem taşımaktadır (Verma ve ark 2024). *Dracocephalum moldavica* L. bitkisinden elde edilen total flavonoid ekstraktı (TFDM), İ/R hasarı modelinde Bax düzeylerini düşürerek, mitokondriyal yoldan apoptoz sürecini belirgin biçimde inhibe etmiştir. Ek olarak, Bcl-2 artışı ve kaspaz-3, -7 ve -9 aktivitelerinin azalması, bu flavonoid kompleksin anti-apoptotik etkisini pekiştirmiştir (Zeng ve ark 2018). Orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) ile oluşturulan serebral iskemi modelinde ise, icariin ve icaritin adlı flavonoidlerin kullanımı, nöronlarda Bax ekspresyonunu azaltmış, Bcl-2 düzeylerini yükseltmiş ve TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı düzeyde düşürmüştür. Bu sonuçlar, bu bileşiklerin beyin dokusunda apoptotik süreci baskılayarak nöroprotektif etki sağladığını göstermektedir (Wu ve ark 2021). Çalışmamızda kullanmış olduğumuz DiOHF apoptotik protein olan Bax seviyelerin önemli düzeyde baskılanmaya yol açarak apoptotizi önemli şekilde azaltmış olması daha önceki farklı deneysel modelde (30 dakika iskemi /30 dakika reperfüzyon) elde edilmiş olan antiapoptotik etki ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışmanın sonuçları sıçanlarda sıçanlarda fokal beyin-iskemi reperfüzyonunda serebellum dokusunda endoplazmik retikulum stresinde önemli moleküller olan GRP78, HSP 70 ve CHOP gibi proteinler önemli artışlar olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte apoptoziste etkili olan Bcl-2 proteini azalırken, Bax protein seviyelerinde yükselmeler görülmüştür.

Ancak İ/R ile birlikte 1 hafta süreli, 10 mg/kg dozda DiOHF takviyesi meydana gelen değişimleri düzeltmiştir.

Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda farklı deneysel modellerle birlikte bu yolaklardaki moleküler araçların daha detaylı bir şekilde incelenmesi mekanizmaların derin bir şekilde ortaya konulmasını sağlayabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Abdullah A, Ravanan P, 2018. Kaempferol mitigates Endoplasmic Reticulum Stress Induced Cell Death by targeting caspase 3/7. *Sci Rep*, 8, 1, 2189.
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24, 1, 35-41.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M, 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci*, 196, 67-76.
- Angelova PR, Abramov AY, 2016. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic Biol Med*, 100, 81-5.
- Anrather J, Iadecola C, 2016. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*, 13, 4, 661-70.
- Ashkenazi A, Dixit VM, 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 5381, 1305-8.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR, 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2, 8, 469-75.
- Berridge MJ, 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32, 5-6, 235-49.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D, 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 6, 326-32.
- Betteridge DJ, 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2 Suppl 1, 3-8.
- Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, Harding H, Novoa I, Varia M, Raleigh J, Scheuner D, Kaufman RJ, Bell J, Ron D, Wouters BG, Koumenis C, 2005. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *Embo j*, 24, 19, 347081.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 1, 9-19.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A, 2008. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585, 2-3, 325-37.
- Boyce M, Yuan J, 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ*, 13, 3, 363-73.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG, 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40, 5, e331-9.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D, 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 6867, 92-6.
- Campbell BCV, Khatri P, 2020. Stroke. *The Lancet*, 396, 10244, 129-42.
- Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Setchell KD, 2006. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr*, 136, 1, 45-51.
- Cetin O, Aladag T, Acar G, Onal U, Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK, 2025. 3',4'-Dihydroxy Flavonol (DiOHF) Exerting a Positive Effect on Neurogenesis and Retinal Damage in Experimental Brain Ischemia-Reperfusion of Rats. *Curr Pharm Des*.
- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM, 2016. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*, 15, 8, 86981.

- Chan EC, Drummond GR, Woodman OL, 2003. 3', 4'-dihydroxyflavonol enhances nitric oxide bioavailability and improves vascular function after ischemia and reperfusion injury in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 42, 6, 727-35.
- Chan SW, 2014. The unfolded protein response in virus infections. *Front Microbiol*, 5, 518.
- Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X, 2023. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 8, 1, 352.
- Chen Y, Peng F, Xing Z, Chen J, Peng C, Li D, 2022. Beneficial effects of natural flavonoids on neuroinflammation. *Front Immunol*, 13, 1006434.
- Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R, 2016. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 41, 57-65.
- Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, Elhabiri M, 2016. In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A StructureActivity Investigation. *PLoS One*, 11, 10, e0165575.
- Choi JH, Choi AY, Yoon H, Choe W, Yoon KS, Ha J, Yeo EJ, Kang I, 2010. Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction. *Exp Mol Med*, 42, 12, 811-22.
- Circu ML, Aw TY, 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48, 6, 749-62.
- Clarke DDaS, Louis, 1999. Regulation of Cerebral Metabolic Rate. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Eds: Siegel GJ, Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D. Philadelphia: Lippincott-Raven, p.
- Cory S, Adams JM, 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 9, 647-56. Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C, 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2986796.
- Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P, 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 52, 18773-84.
- Dai J, Chen L, Qiu YM, Li SQ, Xiong WH, Yin YH, Jia F, Jiang JY, 2013. Activations of GABAergic signaling, HSP70 and MAPK cascades are involved in baicalin's neuroprotection against gerbil global ischemia/reperfusion injury. *Brain Res Bull*, 90, 1-9.
- Dasdelen D, Solmaz M, Mogulkoc R, Baltaci AK, Erdogan E, 2024. Apoptosis of hippocampus and cerebellum induced with brain ischemia reperfusion prevented by 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF). *Biotech Histochem*, 99, 5, 225-37.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME, 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 2, 231-41.
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M, 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581, 19, 3702-10.
- Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B, 2009. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, 4, R1071-7.
- De Maio A, 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11, 1, 1-12.
- DeGracia DJ, Montie HL, 2004. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J Neurochem*, 91, 1, 1-8.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J, 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1, 2, 112-9.

- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A, 2013. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 18, 14, 1818-92.
- Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, Fafournoux P, Tremblais G, Marchant D, Gille T, Bernaudin JF, Callard P, Kambouchner M, Martinod E, Valeyre D, Uzunhan Y, Planès C, Boncoeur E, 2018. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep*, 8, 1, 17939.
- Demir M, Amanvermez R, Kamalı Polat A, Karabıçak I, Cınar H, Kesicioğlu T, Polat C, 2014. The effect of silymarin on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Med Princ Pract*, 23, 2, 140-4.
- Deng C, Yi R, Fei M, Li T, Han Y, Wang H, 2021. Naringenin attenuates endoplasmic reticulum stress, reduces apoptosis, and improves functional recovery in experimental traumatic brain injury. *Brain Res*, 1769, 147591.
- Deng XX, Li SS, Sun FY, 2019. Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling. *Aging Dis*, 10, 4, 807-17.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA, 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22, 9, 391-7.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR, 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149, 5, 1060-72.
- Dixon Scott J, Lemberg Kathryn M, Lamprecht Michael R, Skouta R, Zaitsev Eleina M, Gleason Caroline E, Patel Darpan N, Bauer Andras J, Cantley Alexandra M, Yang Wan S, Morrison B, III, Stockwell Brent R, 2012. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149, 5, 1060-72.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP, 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55, 3, 310-8.
- Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L, 2012. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*, 5, 6, 1453-6.
- Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami TS, Higashida RT, Johnston SC, Kidwell CS, Lutsep HL, Miller E, Sacco RL, 2009. Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack. *Stroke*, 40, 6, 2276-93.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 4, 495-516.
- Eltzschig HK, Eckle T, 2011. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 17, 11, 1391-401.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK, 1998. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15, 8880-5.
- Evans CG, Chang L, Gestwicki JE, 2010. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem*, 53, 12, 4585-602.
- Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM, 2014. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171, 8, 2000-16.
- Fu K, Chen L, Miao L, Guo Y, Zhang W, Bai Y, 2019. Grape Seed Proanthocyanidins Protect N2a Cells against Ischemic Injury via Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial-associated Pathways. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 18, 4, 334-41.
- Fuchs Y, Steller H, 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147, 4, 74258.
- Gabai VL, Sherman MY, 2002. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* (1985), 92, 4, 1743-8.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson

- VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G, 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 1, 107-20.
- Gao Z, Liu G, Hu Z, Li X, Yang X, Jiang B, Li X, 2014. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Med Rep*, 9, 3, 801-7.
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G, 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 286, 3, 433-42.
- Ge R, Kao C, 2019. Cell Surface GRP78 as a Death Receptor and an Anticancer Drug Target. *Cancers*, 11, 11, 1787.
- Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV, 2006. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res*, 66, 23, 11424-31.
- Gonzalez-Gronow M, Gopal U, Austin RC, Pizzo SV, 2021. Glucose-regulated protein (GRP78) is an important cell surface receptor for viral invasion, cancers, and neurological disorders. *IUBMB Life*, 73, 6, 843-54.
- Green DR, Kroemer G, 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 5684, 626-9.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 15, 1899-911.
- Hankey GJ, 2017. Stroke. *The Lancet*, 389, 10069, 641-54.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D, 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 6, 5, 1099-108.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D, 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 5, 5, 897-904.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D, 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmicreticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 6716, 271-4.
- He Y, Wang J, Ying C, Xu KL, Luo J, Wang B, Gao J, Yin Z, Zhang Y, 2024. The interplay between ferroptosis and inflammation: therapeutic implications for cerebral ischemia-reperfusion. *Front Immunol*, 15, 1482386.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 13, 10, 572-84.
- Herculano-Houzel S, 2012. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 Suppl 1, Suppl 1, 10661-8.
- Hetz C, 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 2, 89-102.
- Hetz C, 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 2, 89-102.
- Hetz C, Mollereau B, 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 4, 233-49.
- Hetz C, Papa FR, 2018. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 69, 2, 16981.
- Hetz C, Saxena S, 2017. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*, 13, 8, 477-91.
- Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ, 2020. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 8, 421-38.

- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M, 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*, 165, 3, 347-56.
- Hotamisligil GS, 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140, 6, 900-17.
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S, 2018. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol*, 9, 3083.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J, 2015. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology*, 11, 1, 56-64.
- Iadecola C, Anrather J, 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*, 17, 7, 796-808.
- Ito M, 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, 78, 3-5, 272-303.
- Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA, 2019. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*, 16, 1, 142.
- Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA, 2019. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 16, 1, 142.
- Jin R, Yang G, Li G, 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 87, 5, 779-89.
- Jomova K, Alomar SY, Valko R, Liska J, Nepovimova E, Kuca K, Valko M, 2025. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. *Chem Biol Interact*, 413, 111489.
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW, 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 25, 1, 65-80.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ, 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ, 2012. Chapter Six - Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Eds: Jeon KW: Academic Press, p. 229-317.
- Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*, 2, 702-14.
- Kandel ER, 2013. *Principles of neural science*, New York, McGraw-Hill Medical, p.
- Kapoor R, Kakkar P, 2012. Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes. *PLoS One*, 7, 8, e41663.
- Kase CS, Norrving B, Levine SR, Babikian VL, Chodosh EH, Wolf PA, Welch KM, 1993. Cerebellar infarction. Clinical and anatomic observations in 66 cases. *Stroke*, 24, 1, 76-83.
- Kelley MH, Taguchi N, Ardeshiri A, Kuroiwa M, Hum PD, Traystman RJ, Herson PS, 2008. Ischemic insult to cerebellar Purkinje cells causes diminished GABAA receptor function and allopregnanolone neuroprotection is associated with GABAA receptor stabilization. *J Neurochem*, 107, 3, 668-78.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 4, 239-57.
- Keylani K, Arbab Mojani F, Khalaji A, Rasouli A, Aminzade D, Karimi MA, Sanaye PM, Khajevand N, Nemayandeh N, Poudineh M, Azizabadi Farahani M, Esfandiari MA, Haghshoar S, Kheirandish A, Amouei E, Abdi A, Azizinezhad A, Khani A, Deravi N, 2022. Endoplasmic reticulum as a target in cardiovascular diseases: Is there a role for flavonoids? *Front Pharmacol*, 13, 1027633.
- Khan M, Yu B, Rasul A, Al Shawi A, Yi F, Yang H, Ma T, 2012. Jaceosidin Induces Apoptosis in U87 Glioblastoma Cells through G2/M Phase Arrest. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 703034.

- Khan N, Afaq F, Syed DN, Mukhtar H, 2008. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis*, 29, 5, 1049-56.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM, 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*, 61, 1, 1361779.
- Kicinska A, Jarmuszkiewicz W, 2020. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways? *Molecules*, 25, 13.
- Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, Ogawa S, 2004. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci*, 24, 6, 1486-96.
- Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, Adams CJ, Ali MMU, 2019. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nat Struct Mol Biol*, 26, 11, 1053-62.
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG, 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol*, 22, 21, 740516.
- Krifa M, Leloup L, Ghedira K, Mousli M, Chekir-Ghedira L, 2014. Luteolin induces apoptosis in BE colorectal cancer cells by downregulating calpain, UHRF1, and DNMT1 expressions. *Nutr Cancer*, 66, 7, 1220-7.
- Krishnamurthi R, Feigin V, 2022. Global Burden of Stroke. In. Eds, p. 163-78.e2.
- Kumar S, Pandey AK, 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, 162750.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT, 2014. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 115, 157-88.
- Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G, 2011. Stroke rehabilitation. *The Lancet*, 377, 9778, 1693-702.
- Lau A, Wang S, Jiang J, Haig A, Pavlosky A, Linkermann A, Zhang ZX, Jevnikar AM, 2013. RIPK3 mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *Am J Transplant*, 13, 11, 2805-18.
- Lau YS, Mustafa MR, Choy KW, Chan SMH, Potocnik S, Herbert TP, Woodman OL, 2018. 3',4'-dihydroxyflavonol ameliorates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and endothelial dysfunction in mice. *Sci Rep*, 8, 1, 1818.
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH, 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 23, 21, 7448-59.
- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH, 2008. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, 320, 5882, 1492-6.
- Lee AS, 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*, 26, 8, 504-10.
- Lee AS, 2005. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35, 4, 373-81.
- Lee AS, 2014. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*, 14, 4, 263-76.
- Lei W, Zhuang H, Huang W, Sun J, 2025. Neuroinflammation and energy metabolism: a dual perspective on ischemic stroke. *J Transl Med*, 23, 1, 413.
- Li H, Kelley J, Ye Y, Ye Z-W, Townsend DM, Zhang J, Wu Y, 2025. REDOX Imbalance and Oxidative Stress in the Intervertebral Disc: The Effect of Mechanical Stress and Cigarette Smoking on ER Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Cells*, 14, 8, 613.
- Li Q, Zhang H, Liu X, 2022. Didymin Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Activating the PPAR Signaling Pathway. *Yonsei Med J*, 63, 10, 956-65.

- Li YS, Qin XJ, Dai W, 2017. Fisetin suppresses malignant proliferation in human oral squamous cell carcinoma through inhibition of Met/Src signaling pathways. *Am J Transl Res*, 9, 12, 5678-83.
- Lindquist S, Craig EA, 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22, 631-77.
- Lipton P, 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 4, 1431-568.
- Liu X, Bai M, Fan L, Lou Z, 2022. Serum 4-hydroxynonenal associates with the recurrence of patients with primary cerebral infarction. *Front Cell Neurosci*, 16, 998512.
- Liu Z, Chopp M, 2016. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 144, 103-20.
- Llano I, DiPolo R, Marty A, 1994. Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, 12, 3, 663-73.
- Lu HF, Chie YJ, Yang MS, Lee CS, Fu JJ, Yang JS, Tan TW, Wu SH, Ma YS, Ip SW, Chung JG, 2010. Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. *Int J Oncol*, 36, 6, 1477-84.
- Mahmoud AM, Hernández Bautista RJ, Sandhu MA, Hussein OE, 2019. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 5484138.
- Malhotra JD, Kaufman RJ, 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 6, 716-31.
- Malhotra JD, Kaufman RJ, 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, 9, 12, 2277-93.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C, 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 1 Suppl, 230s42s.
- Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D, 2012. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*, 11, 2, 457-87.
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D, 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18, 24, 3066-77.
- Mayer MP, Bukau B, 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62, 6, 670-84.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ, 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 4, 1249-59.
- Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Chaturvedi S, Creager MA, Eckel RH, Elkind MSV, Fornage M, Goldstein LB, Greenberg SM, Horvath SE, Iadecola C, Jauch EC, Moore WS, Wilson JA, 2014. Guidelines for the Primary Prevention of Stroke. *Stroke*, 45, 12, 3754832.
- Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC, 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 4, 673-751.
- Moradipour A, Dariushnejad H, Ahmadizadeh C, Lashgarian HE, 2022. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis. *Med Oncol*, 40, 1, 46.
- Muchowski PJ, Wacker JL, 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci*, 6, 1, 11-22.
- Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, Abbas K, Moinuddin, Hassan MI, Habib S, Islam S, 2024. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, 13, 22.

- Nakagawa T, Yuan J, 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 150, 4, 887-94.
- Nakka VP, Gusain A, Raghubir R, 2010. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res*, 17, 2, 189-202.
- Ni M, Lee AS, 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*, 581, 19, 3641-51.
- Niu G, Yin S, Xie S, Li Y, Nie D, Ma L, Wang X, Wu Y, 2011. Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 1, 30-7.
- Oakes SA, Papa FR, 2015. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*, 10, 173-94.
- Omar A, Zhou M, Berman A, Sorrentino RA, Yar N, Weintraub NL, Kim IM, Lei W, Tang Y, 2016. Genomic-based diagnosis of arrhythmia disease in a personalized medicine era. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*, 1, 497-504.
- Oyadomari S, Mori M, 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11, 4, 381-9.
- Oz M, Demir EA, Caliskan M, Mogulkoc R, Baltaci AK, Nurullahoglu Atalik KE, 2017. 3',4'Dihydroxyflavonol attenuates spatial learning and memory impairments in global cerebral ischemia. *Nutr Neurosci*, 20, 2, 119-26.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L, 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 1, 315-424.
- Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM, 2016. The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17, 10, 1374-95.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR, 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 5, e47.
- Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M, 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*, 29, 3, 323-31.
- Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ, 2002. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*, 22, 22, 7721-30.
- Paschen W, 2004. Endoplasmic reticulum dysfunction in brain pathology: critical role of protein synthesis. *Curr Neurovasc Res*, 1, 2, 173-81.
- Pasparakis M, Vandenabeele P, 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 7534, 31120.
- Pedely L, Gorelick PB, 2013. Stroke risk factors: impact and management. In: *The Stroke Book*. Eds: Torbey MT, Selim MH, 2. Cambridge: Cambridge University Press, p. 332-46.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C, 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4, 2, 89-96.
- Pietta PG, 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63, 7, 1035-42.
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B, Jauch EC, Kidwell CS, Leslie-Mazwi TM, Ovbiagele B, Scott PA, Sheth KN, Southerland AM, Summers DV, Tirschwell DL, 2018. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 49, 3, e46-e99.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A, 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129, 7, 1337-49.

- Qin CX, Williams SJ, Woodman OL, 2011. Antioxidant activity contributes to flavonol cardioprotection during reperfusion of rat hearts. *Free Radic Biol Med*, 51, 7, 1437-44.
- Quillinan N, Deng G, Shimizu K, Cruz-Torres I, Schroeder C, Traystman RJ, Herson PS, 2017. Longterm depression in Purkinje neurons is persistently impaired following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37, 8, 3053-64.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G, 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, 3, 9, 839-43.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20, 7, 933-56.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C, 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 9, 566-78.
- Ron D, Walter P, 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 7, 519-29.
- Saad HM, Elekhawy E, Shaldam MA, Alqahtani MJ, Altwaijry N, Attallah NGM, Hussein IA, Ibrahim HA, Negm WA, Salem EA, 2024. Rosuvastatin and diosmetin inhibited the HSP70/TLR4 /NF- κ B p65/NLRP3 signaling pathways and switched macrophage to M2 phenotype in a rat model of acute kidney injury induced by cisplatin. *Biomed Pharmacother*, 171, 116151.
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MSV, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee J-M, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV, 2013. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke*, 44, 7, 2064-89.
- Sato M, Maulik N, Das DK, 2002. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, 957, 122-35.
- Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, Jansen O, Jovin TG, Mattle HP, Nogueira RG, Siddiqui AH, Yavagal DR, Baxter BW, Devlin TG, Lopes DK, Reddy VK, du Mesnil de Rochemont R, Singer OC, Jahan R, 2015. Stent retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*, 372, 24, 228595.
- Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G, 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 44, 2, 192-201.
- Schmahmann JD, 2019. The cerebellum and cognition. *Neurosci Lett*, 688, 62-75.
- Schmahmann JD, Sherman JC, 1998. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*, 121 (Pt 4), 561-79.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ, 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 300, 5616, 135-9.
- Semenza GL, 2011. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med*, 365, 6, 537-47.
- Senft D, Ronai ZA, 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40, 3, 141-8.
- Sergiel I, 2024. [Flavonoids – natural compounds with antiviral and anticancer potential]. *Postepy Biochem*, 70, 4, 474-82.
- Shao A, Zhou Y, Yao Y, Zhang W, Zhang J, Deng Y, 2019. The role and therapeutic potential of heat shock proteins in haemorrhagic stroke. *J Cell Mol Med*, 23, 9, 5846-58.
- Sies H, 2020. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel)*, 9, 9.

- Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ, Lu PD, Marciniak SJ, Ron D, Przedborski S, Kholodilov N, Greene LA, Burke RE, 2005. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J Neurochem*, 95, 4, 974-86.
- Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS, 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334, 6059, 1086-90.
- Sofroniew MV, 2014. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, 2, a020420.
- Song G, Ouyang G, Bao S, 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9, 1, 59-71.
- Spencer JP, 2008. Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr*, 99 E Suppl 1, Es60-77.
- Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD, 2017. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 171, 2, 273-85.
- Tabas I, Ron D, 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13, 3, 184-90.
- Tanaka M, Endo H, Sakusa K, Yano M, 2022. Hesperetin induces apoptosis in A549 cells via the Hsp70-mediated activation of Bax. *Int J Oncol*, 61, 6.
- Tao Y, Murakami Y, Vavvas DG, Sonoda KH, 2022. Necroptosis and Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Front Neurosci*, 16, 911430.
- Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ, 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*, 12, 12, 1812-24.
- Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, Truitt M, McManus MT, Ruggero D, Goga A, Papa FR, Oakes SA, 2012. IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, 338, 6108, 818-22.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D, 2000. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287, 5453, 664-6.
- van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG, 2006. Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biol Ther*, 5, 7, 749-55.
- Vance JE, 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 4, 595-609.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP, 2008. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 3, 3-4, 115-26.
- Verma VK, Bhardwaj P, Prajapati V, Bhatia A, Purkait S, Arya DS, 2024. Flavonoids as therapeutics for myocardial ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review on preclinical studies. *Laboratory Animal Research*, 40, 1, 32.
- Villavicencio Tejo F, Quintanilla RA, 2021. Contribution of the Nrf2 Pathway on Oxidative Damage and Mitochondrial Failure in Parkinson and Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*, 10, 7.
- Vogler M, Braun Y, Smith VM, Westhoff M-A, Pereira RS, Pieper NM, Anders M, Callens M, Vervliet T, Abbas M, Macip S, Schmid R, Bultynck G, Dyer MJS, 2025. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10, 1, 91.

- Vogler M, Braun Y, Smith VM, Westhoff MA, Pereira RS, Pieper NM, Anders M, Callens M, Vervliet T, Abbas M, Macip S, Schmid R, Bultynck G, Dyer MJ, 2025. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 10, 1, 91.
- Voogd J, Glickstein M, 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 21, 9, 370-5.
- Walter P, Ron D, 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 6059, 1081-6.
- Wang C, Chen H, Jiang HH, Mao BB, Yu H, 2021. Total Flavonoids of Chuju Decrease Oxidative Stress and Cell Apoptosis in Ischemic Stroke Rats: Network and Experimental Analyses. *Front Neurosci*, 15, 772401.
- Wang H, Chen L, Zhang X, Xu L, Xie B, Shi H, Duan Z, Zhang H, Ren F, 2019. Kaempferol protects mice from d-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Grp78-CHOP signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 111, 468-75.
- Wang M, Kaufman RJ, 2016. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529, 7586, 326-35.
- Wang Z, Jiang C, Chen W, Zhang G, Luo D, Cao Y, Wu J, Ding Y, Liu B, 2014. Baicalein induces apoptosis and autophagy via endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int*, 2014, 732516.
- Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA, 2002. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol*, 89, 331-59.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C, 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36, 7, 838-49.
- Wu C, Xu H, Li J, Hu X, Wang X, Huang Y, Li Y, Sheng S, Wang Y, Xu H, Ni W, Zhou K, 2020. Baicalein Attenuates Pyroptosis and Endoplasmic Reticulum Stress Following Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury via Autophagy Enhancement. *Front Pharmacol*, 11, 1076.
- Wu C-T, Chen M-C, Liu S-H, Yang T-H, Long L-H, Guan S-S, Chen C-M, 2021. Bioactive Flavonoids Icaritin and Icarin Protect against Cerebral Ischemia-Reperfusion-Associated Apoptosis and Extracellular Matrix Accumulation in an Ischemic Stroke Mouse Model. *Biomedicines*, 9, 11, 1719.
- Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD, Kaufman RJ, 2007. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*, 13, 3, 351-64.
- Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, Gu L, 2020. Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Mol Neurosci*, 13, 28.
- Xiang M, Lu Y, Xin L, Gao J, Shang C, Jiang Z, Lin H, Fang X, Qu Y, Wang Y, Shen Z, Zhao M, Cui X, 2021. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 6614009.
- Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, Kang R, Tang D, 2016. Ferroptosis: process and function. *Cell Death & Differentiation*, 23, 3, 369-79.
- Xu W, Lu H, Yuan Y, Deng Z, Zheng L, Li H, 2022. The Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids from Propolis via Nrf2 and NF-κB Pathways. *Foods*, 11, 16, 2439.
- Xu Z, Tao Z, Guo Y, 2025. The role of tea in managing cardiovascular risk factors: potential benefits, mechanisms, and interventional strategies. *Front Nutr*, 12, 1530012.
- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K, 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*, 13, 3, 365-76.
- Yan H-f, Zou T, Tuo Q-z, Xu S, Li H, Belaidi AA, Lei P, 2021. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 1, 49.

- Yan Q, Liu S, Sun Y, Chen C, Yang S, Lin M, Long J, Yao J, Lin Y, Yi F, Meng L, Tan Y, Ai Q, Chen N, Yang Y, 2023. Targeting oxidative stress as a preventive and therapeutic approach for cardiovascular disease. *J Transl Med*, 21, 1, 519.
- Yang J, Ma YM, Yang L, Li P, Jing L, Li PA, Zhang JZ, 2025. Quercetin alleviates cerebral ischemia and reperfusion injury in hyperglycemic animals by reducing endoplasmic reticulum stress through activating SIRT1. *PLoS One*, 20, 4, e0321006.
- Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, Shimizu K, Asai T, Asakawa T, Kan T, Yamada S, Ohizumi Y, Oku N, 2014. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemiareperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res*, 1559, 46-54.
- Yew KS, Cheng E, 2009. Acute stroke diagnosis. *Am Fam Physician*, 80, 1, 33-40.
- Youle RJ, Strasser A, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 1, 47-59.
- Zeng C, Jiang W, Yang X, He C, Wang W, Xing J, 2018. Pretreatment with Total Flavonoid Extract from *Dracocephalum Moldavica* L. Attenuates Ischemia Reperfusion-induced Apoptosis. *Scientific Reports*, 8, 1, 17491.
- Zhan X, Ander BP, Liao IH, Hansen JE, Kim C, Clements D, Weisbart RH, Nishimura RN, Sharp FR, 2010. Recombinant Fv-Hsp70 protein mediates neuroprotection after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 41, 3, 538-43.
- Zhang S, Tang MB, Luo HY, Shi CH, Xu YM, 2017. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis*, 8, 6, e2905.
- Zhang Z, Liu H, Hu X, He Y, Li L, Yang X, Wang C, Hu M, Tao S, 2022. Heat Shock Protein 70 Mediates the Protective Effect of Naringenin on High-Glucose-Induced Alterations of Endothelial Function. *Int J Endocrinol*, 2022, 7275765.
- Zhao Y, Wang W, Qian L, 2007. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 12, 1, 83-95.
- Zheng J, Liao Y, Xu Y, Mo Z, 2022. Icariin attenuates ischaemic stroke through suppressing inflammation mediated by endoplasmic reticulum stress signalling pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 49, 7, 719-30.
- Zhou Q, Meng Y, Li D, Yao L, Le J, Liu Y, Sun Y, Zeng F, Chen X, Deng G, 2024. Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9, 1, 55.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D, 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12, 7, 982-95.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94, 3, 909-50.

7. EKLER

EK-A: Turnitin Raporu

BEYİN İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDA 3',4'- DİHYDROXYFLAVONOLUN SEREBELLUMDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİSİ

ORIGINALITY REPORT

5%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet	210 words – 2%
2	bilselkongreleri.com Internet	84 words – 1%
3	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 Internet	66 words – < 1%
4	www.researchgate.net Internet	63 words – < 1%
5	pdffox.com Internet	39 words – < 1%
6	docplayer.biz.tr Internet	35 words – < 1%
7	Bunsuz, Merve. "Hipoksi/Re-Oksijenasyona Maruz Kalan Kardiyomiyositlerde Metilprednizolon'un Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin	26 words – < 1%



EK-B: Etik Kurul Kararı



8. ÖZGEÇMİŞ

