



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**GPR88'İN AKUT BEYİN HASARI SONRASI
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

MEHMET ÖZGEN ALTINTAŞ

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2025

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji
Tez Sahibi : Mehmet Özgen ALTINTAŞ
Tez Başlığı : GPR88'in AKUT Beyin Hasarı Sonrası Rolünün İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 10.01.2025

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Kurumu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Bayram Ufuk ŞAKUL

Medipol UNV-İstanbul

Dr.Öğr.Üye. Saltuk Buğra BALTACI

Medipol UNV-İstanbul

Dr.Öğr.Üye. Serdar ALTUNAY

Medipol UNV-İstanbul

Doç.Dr. Mustafa Çağlar BEKER

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

MEHMET ÖZGEN ALTINTAŞ

İTHAF



*“Bu tez
sevgili eşime ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana rehberlik eden, desteğini esirgemeyen ve her zaman yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a gönülden teşekkür ederim.

Her daim desteğini hissettiğim, bilgisi ve yapıcı önerileriyle çalışmama yön veren Doç. Dr. Mustafa Çağlar BEKER'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemimde değerli katkıları, desteği ve samimiyetiyle yanımda olan Doç. Dr. Fatma UYSAL ÇINAR'a ayrıca teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan Dr. Öğr. Üye. Serdar ALTUNAY'a, sadece bu süreçte değil, yaşam yolculuğum boyunca bana hissettirdiği dostluk, güven ve destek için en derin minnettarlığımı sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarımızı anlamlı kılan değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üye. Saltuk Buğra BALTACI, Dr. İrem ÇULHA TAŞKIN, Halil İbrahim KOÇ, Sevban BAYIRLI, Ayşenur ÖZPINAR, Buse BALABAN, Çiğdem BAYRAKTAROĞLU, Zehra DEĞİRMENCİ, Enes DOĞAN, Oğuzhan BAYGÜL'e içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman destekleriyle yanımda olan,ve yardımlarını esirgemeyen değerli MEDİTAM ekibine; Ekrem Musa ÖZDEMİR, Ali ŞENBAHÇE, Barış CEBECİ ve Caner BAL'a içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasının her anında yanımda olan, sevgisi, sabrı ve desteğiyle bana güç veren eşim Hilal Melis ALTINTAŞ'a en derin teşekkürlerimi sunuyorum. Onun varlığı, bu zorlu süreçte en büyük dayanağım oldu. Gösterdiği anlayış ve sabır, bu çalışmayı tamamlamamı mümkün kılan en önemli unsurlardan biriydi. Hayatımın her anında olduğu gibi, bu süreçte de bana olan inancın ve verdiği cesaret için minnettarım.

Son olarak beni ben yapan, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme minnettarlığımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| TEZ ONAY FORMU | i |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI | ii |
| İTHAF | iii |
| TEŞEKKÜR..... | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... | ix |
| TABLolar LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | xi |
| 1. ÖZET..... | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 4. GENEL BİLGİLER..... | 5 |
| 4.1. Serebral iskemi ve klinik önemi..... | 5 |
| 4.2. Orta Serebral Arter Tıkanmasının (MCAO) Patofizyolojisi..... | 7 |
| 4.2.1. Orta serebral arterin anatomisi ve fonksiyonu | 7 |
| 4.2.2. MCAO'nin Nedenleri ve Risk Faktörleri | 9 |
| 4.2.3. Serebral Kan Akımı ve Metabolizma Üzerine Etkileri | 10 |
| 4.2.4. İskemik Skar ve Penumbra Bölgesi | 11 |
| 4.2.5. Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar | 12 |
| 4.2.6. Kan-Beyin Bariyeri Disfonksiyonu..... | 15 |
| 4.2.7. Reperfüzyon Hasarı..... | 16 |
| 4.2.8. Nörolojik Fonksiyonlardaki Değişiklikler | 17 |
| 4.2.9. MCAO ile İlişkili Uzun Dönem Etkiler | 18 |
| 4.3. GPR88 Proteini | 20 |
| 4.3.1. GPR88'in Moleküler Biyolojisi ve Genetik Temelleri | 20 |
| 4.3.2. GPR88'in Beyindeki Dağılımı ve Ekspresyon Profili | 21 |
| 4.3.3. GPR88'in Fizyolojik Rollerini | 21 |
| 4.3.4. GPR88 ve Patolojik Durumlarla İlişkisi..... | 22 |
| 4.3.5. GPR88'in Serebral İskemideki Potansiyel Rolü..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.6. GPR88'i Hedef Alan Terapötik Yaklaşımlar | 24 |
| 4.3.7. Literatürde GPR88 ile İlgili Çalışmalar | 25 |
| 5. MATERYAL METOT..... | 27 |
| 5.1. Deney Planı ve Deney Grupları | 27 |
| 5.2. Moleküler Klonlama Çalışmaları | 28 |
| 5.2.1. Lentiviral vektör | 28 |
| 5.2.2. Hücre hattından toplam RNA izolasyonu | 29 |
| 5.2.3. cDNA sentezi | 29 |
| 5.2.4. Primer dizaynı | 30 |
| 5.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)..... | 31 |
| 5.2.6. Agaroz jelden DNA izolasyonu | 33 |
| 5.2.7. Dna ürününün ve lentiviral vektörün restriksiyon enzimleri ile kesilmesi .. | 34 |
| 5.2.8. GPR88 DNA ürününün ve lentiviral vektörün saflaştırılması, konsantre edilmesi | 34 |
| 5.2.9. GPR88 DNA ürününün ve lentiviral vektörün birleştirilmesi | 35 |
| 5.2.10. Kompetent bakteri hazırlama | 35 |
| 5.2.11. Transformasyon..... | 36 |
| 5.2.12. Transformasyon sonrası GPR88 için koloni pcr yapılması..... | 36 |
| 5.2.13. Plazmid izolasyonu | 38 |
| 5.2.14. Restriksiyon enzimleri ile plazmidlerin konfirme edilmesi | 38 |
| 5.2.15. Plazmid sayısının yüksek miktarda çoğaltılması ve izolasyonu | 39 |
| 5.2.16. Lentivirüslerin paketlenmesi ve üretimi..... | 39 |
| 5.2.17. Primer striatal hücre kültürünün yapılması | 41 |
| 5.2.18. Lentivirüs titrasyonunun belirlenmesi..... | 41 |
| 5.2.18.1. Protein izolasyonu, konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması..... | 42 |
| 5.2.18.2. Western Blot..... | 42 |
| 5.3. Lentivirüslerin Beyin İçi Enjeksiyon Yöntemi ile Farelere Verilmesi | 43 |
| 5.4. Orta Serebral Arter Tıkama Metodu (MCAO)..... | 44 |
| 5.5. Davranış Deneyleri..... | 45 |
| 5.5.1. Açık Alan Testi | 46 |
| 5.6. Nörolojik Skorlama | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 5.6.1. Bederson nörolojik skoru | 47 |
| 5.6.2. Modifiye edilmiş Garcia nörolojik skorlaması..... | 47 |
| 5.6.2.1. Spontan etkinlik..... | 47 |
| 5.6.2.2. Dört uzvun hareketinde simetri | 48 |
| 5.6.2.3. Ön pati uzatma..... | 48 |
| 5.6.2.4. Vücut proprioepsiyon..... | 48 |
| 5.6.3. Modifiye edilmiş Modo nörolojik testi | 48 |
| 5.6.3.1. Spontan motilite..... | 48 |
| 5.6.3.2. Doğrulma refleksi..... | 49 |
| 5.6.3.3. Kavrama refleksi | 49 |
| 5.7. Cryostat Cihazı ile Beyin Kesimi..... | 49 |
| 5.8. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar..... | 49 |
| 5.8.1. Cresyl violet boyaması, hasar hacmi ve beyin ödemi hesaplanması..... | 49 |
| 5.8.2. DNA fragmentasyon analizi | 50 |
| 5.8.3. Nöronal sağkalım analizi..... | 50 |
| 5.8.4. İmmunoglobulin G Boyaması | 51 |
| 5.9. İstatistiksel Analiz | 51 |
| 6. BULGULAR | 53 |
| 6.1. Moleküler Çalışmalar | 53 |
| 6.1.1. Aşırı ekspresyon bulguları | 53 |
| 6.1.2. Baskılama bulguları..... | 54 |
| 6.2. GPR88'in Serebral Kan Akımı Üzerindeki Etkileri..... | 56 |
| 6.3. GPR88'in Serebral İskemi Modelinde Nörolojik Etkileri..... | 58 |
| 6.3.1. 60 dakika MCAO modelinde GPR88'in nörolojik etkileri | 58 |
| 6.3.1.1. Bederson nörolojik skorlaması | 58 |
| 6.3.1.2. Modifiye edilmiş Garcia skorlaması | 58 |
| 6.3.1.3. Modifiye edilmiş Modo skorlaması..... | 60 |
| 6.3.1.4. Modifiye edilmiş Toplam skorlama | 61 |
| 6.3.2. 30 dakika MCAO modelinde GPR88'in Nörolojik Etkileri..... | 63 |
| 6.3.2.1. Alınan mesafe üzerine etkisi | 63 |
| 6.3.2.2. Ortalama hız üzerine etkisi | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3.2.3. Hareketli geçirilen süre üzerine etkisi | 64 |
| 6.3.2.4. Rotasyon sayısı üzerine etkisi | 65 |
| 6.3.2.5. Kenar bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi | 66 |
| 6.3.2.6. Geçiş bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi..... | 66 |
| 6.3.2.7. Merkez bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi | 67 |
| 6.4. GPR88'in Hasar ve Ödem Hacmi Üzerine Etkisi | 68 |
| 6.4.1. Hasar hacmi analizi | 68 |
| 6.4.2. Ödem analizi | 69 |
| 6.5. GPR88'in Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği Üzerine Etkisi | 70 |
| 6.6. GPR88'in Nöronal Sağkalım Üzerine Etkisi | 71 |
| 6.7. GPR88'in Apoptotik Hücre Sayısı Üzerine Etkisi | 71 |
| 7. TARTIŞMA | 74 |
| 8. SONUÇ..... | 81 |
| 9. KAYNAKLAR..... | 83 |
| 10. ETİK KURUL ONAYI..... | 89 |
| 11. ÖZGEÇMİŞ..... | 90 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---------------------------------|--|
| AMPA: | α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid |
| KBB: | Kan Beyin Bariyeri |
| DNA: | Deoksiribonükleik Asit |
| ERK: | Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz |
| GPR88: | G-Protein coupled receptor 88 |
| IL: | İnterlökin |
| iNOS: | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| LPS: | Lipopolisakkarit |
| NF-κB: | Nuclear factor kappa B |
| NMDAR: | N-metil-D-aspartat reseptörü |
| MCAO: | Orta Serebral Arter Tıkanması |
| PCR: | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| ROS: | Reaktif Oksijen Türleri |
| RT-PCR: | Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction |
| TLR: | Toll-Like Receptor |

TABLULAR LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 5.2.3.1: cDNA malzeme protokolü..... | 30 |
| Tablo 5.2.3.2: cDNA termal döngü cihazı basamakları..... | 30 |
| Tablo 5.2.5.1: 0,2 mM Primer Konstrasyonu için PCR Reaksiyon Malzemeleri..... | 32 |
| Tablo 5.2.5.2: 0,5 mM Primer Konstrasyonu için PCR Reaksiyon Malzemeleri..... | 32 |
| Tablo 5.2.5.3: PCR reaksiyon basamakları..... | 33 |
| Tablo 5.2.7.1: Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Reaksiyonu bileşenleri..... | 34 |
| Tablo 5.2.9.1: GPR88 Birleşme Reaksiyonu Bileşenleri..... | 35 |
| Tablo 5.2.12.1: Koloni PCR protokolü..... | 37 |
| Tablo 5.2.14.1: Restriksiyon Reaksiyonu Bileşenleri..... | 38 |
| Tablo 5.2.16.1: A tüpü reaksiyon bileşenleri..... | 41 |
| Tablo 5.2.16.2: B tüpü reaksiyon bileşenleri..... | 41 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 4.2.1: Proksimal orta serebral arterin intralüminal filamentle oklüzyonu amacıyla ventral boyun bölgesinin diseksiyon süreci..... | 7 |
| Şekil 4.2.2: İskemik inmede görülen temel patofizyolojik süreçlerin kısa bir özeti.. | 14 |
| Şekil 5.1.1: pLenti-EF1 α -GFP-2A-Puro plazmidinin genel yapısı. | 28 |
| Şekil 5.2.1: NEB Biolabs Tm Calculator programı kullanılarak hesap edilen uygun Tm değerleri..... | 31 |
| Şekil 5.2.2: PCR sonrası agaroz jel görüntüsü | 33 |
| Şekil 5.2.3: Koloni PCR sonrası agaroz jel görüntüsü | 37 |
| Şekil 5.2.4: Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü ... | 39 |
| Şekil 5.3.1: Virüslerin beyin içi enjeksiyon yöntemi ile striatuma verilmesi..... | 43 |
| Şekil 5.4.1: Lazer Doppler Akış (LDF) kaydı. | 45 |
| Şekil 5.5.1: Açık alan testi için kullanılan deney düzeneği..... | 46 |
| Şekil 6.1.1: GPR88 aşırı ifade (overexpression) grubunda GPR88 protein lokalizasyonu ve hücreSEL görünümü..... | 53 |
| Şekil 6.1.2: GPR88 aşırı ekspresyonunun GPR88 protein seviyeleri üzerindeki etkisi. | 54 |
| Şekil 6.1.3: GPR88 inhibisyon grubunda GPR88 protein ekspresyonu ve lokalizasyonu..... | 55 |
| Şekil 6.1.4: GPR88 inhibisyonuna yönelik shRNA'ların GPR88 protein seviyeleri üzerindeki etkisi. | 56 |
| Şekil 6.2.1: 60 dakika MCAO modelinde Lazer Doppler akış grafikleri ile serebral kan akımını değerlendirmesi..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Şekil 6.2.2: 30 dakika MCAO modelinde Lazer Doppler akış grafikleri ile serebral kan akımı değerlendirilmesi..... | 57 |
| Şekil 6.3.1: Bederson nörolojik skorlarının değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli)..... | 58 |
| Şekil 6.3.2: Modifiye edilmiş Garcia testi ile nörolojik fonksiyon değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli)..... | 59 |
| Şekil 6.3.3: Bederson skoru ve modifiye Garcia testi skorları arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli)..... | 59 |
| Şekil 6.3.4: Modifiye edilmiş Modo testi ile motor fonksiyon değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli)..... | 60 |
| Şekil 6.3.5: Bederson skoru ve modifiye Modo testi skorları arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli)..... | 61 |
| Şekil 6.3.6: Modifiye edilmiş Toplam skor ile motor fonksiyon değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli)..... | 62 |
| Şekil 6.3.7: Bederson skoru ve modifiye edilmiş Toplam Skor arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli)..... | 62 |
| Şekil 6.3.8: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) toplam mesafe değerlendirilmesi (30 dakika MCAO modeli) | 63 |
| Şekil 6.3.9: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) ortalama hız değerlendirilmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 64 |
| Şekil 6.3.10: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) hareketli geçirilen süre değerlendirilmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 64 |
| Şekil 6.3.11: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) yapılan rotasyon sayısı değerlendirilmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 65 |
| Şekil 6.3.12: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) kenar bölgesinde geçirilen süre değerlendirilmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Şekil 6.3.13: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) geçiş bölgesinde geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 67 |
| Şekil 6.3.14: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) merkez bölgesinde geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli)..... | 67 |
| Şekil 6.4.1: Cresyl violet boyaması ile 60 dakika MCAO modeli sonrası hasar hacmi değerlendirmesi..... | 68 |
| Şekil 6.4.2: Toplam skor ve hasar hacmi arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). | 69 |
| Şekil 6.4.3: Cresyl violet boyaması ile 60 dakika MCAO modeli sonrası ödem değerlendirmesi..... | 69 |
| Şekil 6.5.1: IgG ekstravazasyonu ile kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli). | 70 |
| Şekil 6.6.1: NeuN boyaması ile nöronal sağkalım değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli) | 71 |
| Şekil 6.7.1: TUNEL boyaması ile DNA fragmentasyonu ve apoptotik hücre sayısı değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli)..... | 72 |
| Şekil 6.7.2: DNA fragmentasyonu ve nöronal sağkalım arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). | 73 |

1. ÖZET

GPR88'İN AKUT BEYİN HASARI SONRASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Beyne giden kan akışının azalmasıyla karakterize bir durum olan serebral iskemi, nöronal hasara ve beyin fonksiyonlarında bozulmaya yol açarak yıkıcı sonuçlar doğurabilir. Serebral iskemi, beyne giden kan akışının azalmasıyla ortaya çıkar ve hücresel düzeyde enerji krizi, inflamasyon, oksidatif stres ve nöronal ölüm gibi mekanizmaları tetikler. İskeminin etkilerini hafifletmek için yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi çok önemlidir ve yetim G protein-bağlı reseptör GPR88 umut verici bir aday olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmamız, serebral iskemi sonucu meydana gelen akut beyin hasarında GPR88 proteininin rolünü incelemek amacıyla yapılmıştır. GPR88'in bu süreçteki etkilerini anlamak için orta serebral arter tıkanıklığı (MCAO) modeli kullanılarak farelerde deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Araştırmamız, GPR88'in aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının nörolojik fonksiyonlar, doku hasarı, beyin ödemi ve kan-beyin bariyeri geçirgenliği üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. Çalışmamızda histokimyasal boyamalar, moleküler analizler ve davranış testleri uygulanmış; bulgular istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, GPR88'in aşırı ekspresyonunun iskemik hasar alanını küçülttüğünü, ödemi azalttığını ve nörolojik fonksiyonları anlamlı düzeyde iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, GPR88'in, kan-beyin bariyeri bütünlüğünü korumada ve apoptotik hücre ölümünü azaltmada etkili olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, GPR88'in serebral iskemi tedavisinde terapötik bir hedef olabileceğini desteklemektedir. Çalışmamız, GPR88'in nöroprotektif etkilerine dair önemli veriler sağlamış ve serebral iskemi patofizyolojisine ilişkin yeni perspektifler sunmuştur.

Anahtar Kelimeler: akut serebral iskemi, GPR88, kan beyin bariyeri, motor fonksiyon, nöronal sağkalım

2. ABSTRACT

THE ROLE OF GPR88 AFTER ACUTE BRAIN INJURY

Cerebral ischemia, a condition characterized by reduced blood flow to the brain, can have devastating consequences, leading to neuronal damage and impaired brain function. Cerebral ischemia is caused by a reduction in blood flow to the brain, which in turn triggers a series of mechanisms that result in an energy crisis, inflammation, oxidative stress, and neuronal death at the cellular level. The identification of novel therapeutic targets to alleviate the effects of ischemia is of great importance, and the orphan G protein-coupled receptor GPR88 has emerged as a promising candidate for this purpose. The objective of our study was to investigate the role of the GPR88 protein in acute brain injury caused by cerebral ischemia. To ascertain the impact of GPR88 in this process, experimental studies were conducted in mice using the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. The objective of our study was to evaluate the effects of GPR88 overexpression and suppression on neurological functions, tissue damage, brain edema, and blood-brain barrier permeability. In this study, histochemical staining, molecular analysis, and behavioral tests were conducted, and the findings were subjected to statistical analysis. The results demonstrated that GPR88 overexpression diminished the ischemic injury area, reduced edema, and markedly enhanced neurological functions. Additionally, GPR88 was shown to be efficacious in preserving blood-brain barrier integrity and mitigating apoptotic cell death. These findings substantiate the potential of GPR88 as a therapeutic target in the management of cerebral ischemia. Our study provides crucial insights into the neuroprotective effects of GPR88 and offers novel perspectives on the pathophysiology of cerebral ischemia.

Keywords: acute cerebral ischemia, blood brain barrier, GPR88, motor function, neuronal survival

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral Serebral iskemi, yani beyne giden kan akışının azalması, önemli nörolojik etkileri olan kritik bir tıbbi durumdur (1). Serebral iskeminin en sık nedenlerinden biri, yıkıcı sonuçları olabilen orta serebral arterin tıkanmasıdır (2,3). Orta serebral arter, frontal, parietal ve temporal loblar da dahil olmak üzere beynin önemli bir bölümünü perfüze eden önemli bir damardır. Bu arter bir trombus veya emboli nedeniyle tıkanıldığında, etkilenen beyin bölgesi ciddi bir oksijen ve besin yoksunluğu yaşar ve kalıcı nörolojik bozukluk ve hatta ölümle sonuçlanabilecek karmaşık bir patofizyolojik süreçler dizisini tetikler (1). Bu durumun klinik önemi, orta serebral arter oklüzyonunun, etkilenen spesifik beyin bölgesine bağlı olarak hemiparezi, afazi, ihmal ve bilişsel bozukluklar gibi geniş bir nörolojik defisit spektrumuna yol açabilmesidir.

G-protein bağlantılı bir reseptör olan GPR88, çeşitli nörolojik işlevlerle olan ilişkisi nedeniyle sinirbilim alanında umut verici bir hedef olarak ortaya çıkmıştır. GPR88 öncelikle motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçler için kritik bir beyin bölgesi olan striatumda ifade edilir (4). İlginç bir şekilde, insanlarda Gpr88 genindeki homozigot zararlı mutasyonlar, çocukluk koresi, öğrenme güçlüğü ve konuşma geriliği ile karakterize gelişimsel bir bozuklukla ilişkilendirilmiştir (4). Hayvan çalışmaları, GPR88'in motor ve duygusal davranışları düzenlemedeki rolünü daha da aydınlatmıştır. Gpr88 geninden yoksun fareler hiperlokomosyon, artan stereotipiler, motor koordinasyon ve öğrenme eksikliklerinin yanı sıra anksiyete benzeri davranışlarda azalma ve yeni ortamlara alışmada başarısızlık sergilemektedir (4).

GPR88'in striatumdaki D1R tipi ve D2R tipi orta dikenli nöronların işlevini modüle etmedeki farklı rolleri gözlemlenmiştir. GPR88, yüksek oranda ve neredeyse sadece eksprese edildiği striatumda çok önemli bir rol oynamaktadır. Reseptörün motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçlere katılımı, nörolojik bozukluklar için terapötik bir hedef olarak potansiyelini vurgulamaktadır (4–6).

Çalışmamızın amacı, akut serebral iskemi modeli üzerinde GPR88'in aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının etkilerini araştırarak, bu reseptörün patofizyolojik süreçlerdeki rolünü ortaya koymaktır. Bu bağlamda hipotezimiz, GPR88 aktivitesinin modüle edilmesinin, iskemi sırasında nörolojik fonksiyonların korunması ve apoptotik hücre ölümünün azaltılmasında etkili olabileceğidir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Serebral iskemi ve klinik önemi

Beyne giden kan akışında azalma ile karakterize bir durum olan serebral iskemi, hem bireysel hem de kamu sağlığı açısından derin etkilere sahiptir. Kan akışındaki bu azalma, iskemik olayın spesifik konumuna ve şiddetine bağlı olarak bir dizi zayıflatıcı nörolojik ve nöropsikolojik semptomla sonuçlanabilir. Bunlar arasında bilişsel bozukluklar, motor işlev bozukluğu, duysal bozukluklar ve hatta ciddi vakalarda kalıcı beyin hasarı veya sakatlık yer alır. Serebral iskeminin uzun vadeli sonuçlarını en aza indirmek ve hasta sonuçlarını iyileştirmek için hızlı tanıma ve uygun tıbbi müdahale çok önemlidir (7).

Serebral iskemi, ateroskleroz, tromboz ve emboli gibi altta yatan çeşitli patofizyolojik mekanizmalardan kaynaklanabilir (8). Tüm serebral damar tıkanıklıklarının yaklaşık %75'ini oluşturan emboliler, beyinde fokal olarak engellenmiş kan akışının en sık nedenidir (1).

Bir hastanın yaşadığı spesifik semptomlar büyük ölçüde beyin etkilenen kesin bölgesine ve kan akışındaki azalmanın boyutuna bağlı olduğundan, serebral iskeminin klinik sunumu büyük ölçüde değişebilir. Farklı beyin bölgeleri iskemik hücre hasarı için farklı eşiklere sahiptir; beyaz madde gri maddeden daha dirençlidir ve striatumdaki orta dikenli nöronlar gibi belirli nöron popülasyonları iskemik hasara karşı diğerlerine göre seçici olarak daha savunmasızdır (9). Serebral iskeminin sonuçları hem geçici hem de kalıcı olabilir ve birey, sosyal ağı ve bir bütün olarak toplum üzerinde önemli ve geniş kapsamlı etkiler yaratma potansiyeline sahiptir (3).

Serebral iskeminin sonuçları hem birey hem de bir bütün olarak toplum için derin olabilir. İskeminin derinliğine ve süresine, beyindeki konumuna ve ilgili kan damarlarının boyutuna ve dağılımına bağlı olarak, beyin fonksiyonlarında ortaya çıkan

bozulma geçici veya kalıcı, fokal veya daha genel olabilir ve algılanamayan semptomlardan ölüme kadar değişebilir (3).

Serebral iskeminin klinik önemini kabul etmek çok önemlidir, çünkü bu durumun sonuçlarının hem önlenebilir hem de tedavi edilebilir olduğu artık iyi bilinmektedir. Erken teşhis ve hızlı müdahale önemli olsa da, bazı uzmanlar serebral iskeminin uzun vadeli etkisinin en aza indirilmesinin zor olabileceğini, çünkü durumun ciddi vakalarda kalıcı beyin hasarına ve sakatlığa yol açabileceğini savunmaktadır. İlk tedaviden sonra bile hastaları desteklemek için devam eden yönetim ve rehabilitasyon çabaları gerekebilir. Bununla birlikte, önleme, akut bakım ve uzun vadeli iyileşmeye yönelik kapsamlı bir yaklaşım, bu zayıflatıcı durumdan etkilenen bireylerin sonuçlarını iyileştirmek için çok önemlidir.

Tıbbi teknolojideki önemli ilerlemeler, serebral iskeminin altında yatan patofizyolojinin daha iyi anlaşılmasıyla birleştiğinde, çok çeşitli son teknoloji teşhis ve tedavi müdahalelerinin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Bu yenilikler, klinisyenlerin bu zayıflatıcı durumun tespiti, yönetimi ve tedavisine yaklaşımında devrim yaratmıştır (1). İskemik hasarın kapsamı ve yeri hakkında ayrıntılı bilgi sağlayan sofistike nörogörüntüleme tekniklerinden, kan akışını yeniden sağlamayı ve serebral iskeminin etkisini azaltmayı amaçlayan hedefe yönelik farmakolojik tedavilere ve minimal invaziv cerrahi prosedürlere kadar, alan son yıllarda kayda değer ilerlemelere tanık olmuştur. Bu ilerlemeler, hasta sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirme, sağlık sistemleri üzerindeki yükü azaltma ve nihayetinde bu karmaşık ve çok yönlü nörolojik bozukluktan etkilenen bireylerin yaşam kalitesini artırma potansiyeline sahiptir.

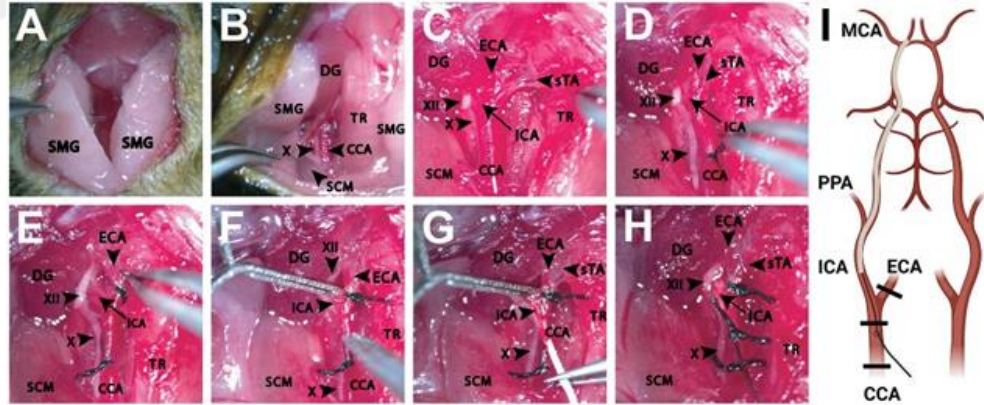
Bu ilerlemelere rağmen, serebral iskeminin yönetimi, özellikle büyük damarlı akut iskemik inme durumunda önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir (10). Büyük bir serebral arterin tamamen veya tama yakın tıkanması ile karakterize edilen büyük damar tıkanıklığı, genellikle daha yüksek ciddi nörolojik defisit riski ve daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (11). Etkilenen beyin bölgesine kan akışının zamanında yeniden sağlanması kritik öneme sahiptir, ancak bu hedefe ulaşmak son derece karmaşık ve çeşitli engellerle dolu olabilir. Vasküler oklüzyonun kesin yeri ve

kapsamı, kollateral kan akışı paternleri ve hastanın klinik özellikleri gibi faktörlerin tümü, mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliğini etkileyebilir. Ayrıca, hemorajik komplikasyon riski ve geri dönüşü olmayan beyin hasarı potansiyeli, bu akut iskemik olayların yönetimini daha da karmaşık hale getirmektedir (12). Devam eden araştırmalar ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, büyük damarlı akut iskemik inmenin ortaya çıkardığı benzersiz zorlukları ele almak ve bu yıkıcı serebral iskemi formunu yaşayan hastalar için genel prognozu iyileştirmek için gereklidir.

4.2. Orta Serebral Arter Tıkanmasının (MCAO) Patofizyolojisi

4.2.1. Orta serebral arterin anatomisi ve fonksiyonu

Orta serebral arter, serebral vasküler sistemin çok önemli bir bileşenidir ve normal beyin fonksiyonlarının sürdürülmesinde ve yeterli serebral kan akışının sağlanmasında hayati bir rol oynar. İnternal karotid arterden köken alan orta serebral arter, serebral arterlerin en büyüğü ve en karmaşık olanıdır (13,14). Yan yüzeyler ve temporal lobların tabanı da dahil olmak üzere serebral hemisferlerin önemli bir bölümünü besleyerek geniş bir şekilde dallanır (14).



Şekil 4.2.1: Proksimal orta serebral arterin intralüminal filamentle oklüzyonu amacıyla ventral boyun bölgesinin diseksiyon süreci. (A) İlk servikal insizyon, iki taraflı submandibular bezlerin (SMG) görünür hale gelmesini sağlar. (B) Parotis bezlerinin (PG) uygun şekilde geri çekilmesi ve ardından yapılan daha ileri künt diseksiyon, alttaki anatomik yapıların ortaya konulmasına olanak tanır. Bu sırada, sternokleidomastoid (SCM) ve digastrik kas (DG) gibi komşu kas yapılarının doğru tespiti, genellikle bu yapıların alt bölgesinde yer alan ortak karotid arterin (CCA)

bulunmasına yardımcı olur. (C) Diseksiyonun dikkatli yürütülmesi ve büyütmenin artırılmasıyla CCA ve dalları (iç karotid arter - ICA, dış karotid arter - ECA, superior tiroid arter - sTA) ile birlikte yakındaki kraniyal sinirler (X, vagus; XII, hipoglossal) de net bir şekilde ortaya çıkarılır. Gerek görüldüğünde, trakea (TR) medial yönde biraz daha geri çekilerek cerrahi alanın daha iyi düzenlenmesi sağlanır. (D) Daha sonra CCA 6-0 ipek suturele bağlanır, bu esnada CCA'nın inferolateralinden geçen vagus sinirinin zarar görmemesine özen gösterilir. (E) ECA çevresine, sTA'nın dallandığı noktanın altında ikinci bir 6-0 ipek ligasyon uygulanır. (F) Sonrasında, hipoglossal sinire zarar vermemek için dikkat gösterilerek ICA üzerine geçici bir damar klempsi yerleştirilir. Ardından, bir arteriyotomi gerçekleştirilir ve olası kanama kontrol altına alınır. (G) Hemodinamik denge sağlandıktan sonra silikon monofilament arteriyotomi bölgesinden içeri doğru nazikçe ilerletilir ve ICA dallanma noktasına yönlendirilir. (H) Geçici damar klempsi çıkarıldığında, monofilament yaklaşık 10 mm daha itilir ve ICA-MCA dallanma noktasına ulaşılır. Direnç oluştuğunda monofilamentin zorlanmamasına dikkat edilmeli, sabit kalması için ek bir 6-0 ipek suture kullanılmalıdır. (I) Şematik, ventral açıdan bakıldığında, MCA'nın kökenine intralüminal tıkanma uygulamak amacıyla ICA'ya yerleştirilen filamentin ilgili anatomik ilişkilerini gösterir. Kalın siyah çizgiler suture bağlarının konumlarını temsil etmektedir (15).

Orta serebral arter beynin tabanında, karotis sarnıcı içinde internal karotis arterden çıkar. Daha sonra sylvian fissür içinde lateral olarak seyreder ve sonunda frontal, parietal ve temporal lobları besleyen birkaç dala ayrılır (16). Bu dallar arasında superior, orta ve inferior temporal arterlerin yanı sıra beynin ilgili bölgelerine kan sağlayan prefrontal, precentral ve santral arterler yer alır (14).

Orta serebral arterden gelen geniş dal ağı, düzgün beyin fonksiyonu için kritik olan serebral kortekse zengin oksijenli kan tedarikini sağlar. İskemik inme durumunda olduğu gibi orta serebral arterden kan akışının kesilmesi, etkilenen belirli bölgelere bağlı olarak hemiparezi, afazi ve bilişsel bozukluk gibi yıkıcı sonuçlara yol açabilir (14).

Orta serebral arter, beynin tabanında bulunan ve ana serebral arterleri birbirine bağlayan vasküler bir yapı olan Willis çemberi ile de yakından ilişkilidir (14). Bu

anatomik düzenleme, ana damarlardan birinde tıkanma veya darlık olması durumunda yeterli serebral perfüzyonu sürdürmek için bir yedek sistem sağlayarak kollateral kan akışına izin verir.

4.2.2. MCAO'nin Nedenleri ve Risk Faktörleri

Orta serebral arter, frontal, parietal ve temporal loblar dahil olmak üzere beynin önemli bir kısmına oksijenli kan sağlamaktan sorumlu kritik bir kan damarıdır. Orta serebral arter tıkanıklığı olarak bilinen bu arterin tıkanması veya tıkanması, ciddi nörolojik bozukluklara ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden sonuçlara yol açabilen ciddi bir durumdur.

Orta serebral arter tıkanıklığının başlıca nedenleri genel olarak üç ana mekanizmaya ayrılabilir: tromboz, emboli ve ateroskleroz (1). Tromboz, genellikle hipertansiyon, diyabet veya genetik yatkınlık gibi altta yatan vasküler hastalıkların bir sonucu olarak orta serebral arterin içinde bir kan pıhtısı oluşumunu ifade eder. Embolizm ise kalp veya karotid arterler gibi uzak bir bölgeden gelen bir pıhtı veya diğer yabancı maddelerin yerinden oynayarak orta serebral artere gitmesi ve tıkanmaya neden olmasıyla ortaya çıkar (1). Arterlerde plak birikimi ile karakterize bir durum olan ateroskleroz da orta serebral arterin daralmasına ve sonunda tıkanmasına yol açabilir (7).

Orta serebral arter tıkanıklığının gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Hipertansiyon veya yüksek kan basıncı, damar duvarına zarar verebileceği ve kan pıhtısı oluşumunu teşvik edebileceği için önemli bir risk faktörüdür (3). Yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize metabolik bir bozukluk olan diabetes mellitus, aterosklerozun ilerlemesini hızlandırabildiği ve tromboz riskini artırabildiği için bir diğer önemli risk faktörüdür (3,13). Kardiyovasküler hastalıklar için iyi bilinen bir risk faktörü olan sigara, muhtemelen vasküler sistem üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle orta serebral arter tıkanıklığı riskinin artmasıyla da ilişkilendirilmiştir (1,3,13).

Bu değiştirilebilir risk faktörlerine ek olarak, genetik yatkınlık da orta serebral arter tıkanıklığının gelişiminde rol oynayabilir (11). Bazı genetik varyantlar veya

mutasyonlar, bir bireyin trombofili veya erken ateroskleroz gibi arter tıkanıklığına yol açabilecek altta yatan koşullara duyarlılığını artırabilir.

4.2.3. Serebral Kan Akımı ve Metabolizma Üzerine Etkileri

Önemli boyutu ve anatomik karmaşıklığı göz önüne alındığında, orta serebral arter, serebral neokorteksin önemli bir bölümünü perfüze etmede kritik bir rol oynar ve uygun beyin fonksiyonunu sürdürmek için öneminin altını çizer (13). Bu temel damarın tıkanması, serebral kan akışını ve metabolik süreçleri derinden bozarak derin sonuçlar doğurabilir.

Orta serebral arter, internal karotid arterden ayrılır ve lateral serebral hemisferlerin çoğunun yanı sıra temporal lobların tabanını beslemekten sorumludur (14). Bu arter bir trombus veya emboli oluşumu yoluyla tıkanıldığında, ortaya çıkan iskemi, derhal ele alınmazsa nihayetinde geri dönüşü olmayan beyin hasarıyla sonuçlanabilecek bir dizi patofizyolojik değişikliğe yol açar. Orta serebral arter tıkanıklığının birincil etkilerinden biri, beynin etkilenen bölgelerine serebral kan akışında önemli bir azalmadır.

Kan akışındaki bu azalma, beyin dokusunu hücre solunum ve enerji üretimi için gerekli olan önemli oksijen ve glikozdan mahrum bırakır. Oksijen ve glikoz eksikliği, nöronlar ve destekleyici glial hücreler artık oksidatif fosforilasyon yoluyla yeterli ATP üretmediği için hücre solunumunu bir enerji krizine tetikler. Bu enerji açığı iyon homeostazının bozulmasına yol açar, çünkü hücreler gerekli transmembran gradyanlarını koruyamaz, bu da hücre içi sodyum ve kalsiyum birikiminin yanı sıra potasyum ekstrüzyonuna neden olur (1). Özellikle kalsiyum akışı, nihayetinde hücre solunumunun tahrip olmasına ve apoptoza yol açan bir dizi enzimatik süreci aktive edebilir.

Ayrıca, oksijen ve glikoz yoksunluğu da beyin hücrelerindeki normal metabolik yolları bozarak laktik asit birikimine ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir. Bu metabolik bozukluklar hücre solunumunu hasarı daha da şiddetlendirerek sonuçta etkilenen beyin bölgelerindeki nöronların ve glial hücrelerin ölümüyle sonuçlanır (1,3).

Orta serebral arter tıkanıklığının yeri ve şiddeti, ortaya çıkan iskemik hasarı büyük ölçüde etkileyebilir ve bu da motor beceriler, dil yetenekleri ve bilişsel süreçler

gibi bir dizi nörolojik işlevi tehlikeye atabilir. Ne yazık ki, orta serebral arter tıkanıklığı olan bireyler için prognoz genellikle kötüdür, tekrarlayan inme riskinin artması ve ölüm oranlarının yükselmesi ile karakterizedir. Özellikle, iskemiden etkilenen beyin dokusunun boyutu, serebral korteks ve subkortikal yapıların hangi bölgelerinin en ciddi şekilde bozulduğuna bağlı olarak motor koordinasyon, konuşma ve dil üretimi ve üst düzey bilişsel işlevlerde zayıflatıcı eksikliklere yol açabilir (10). Ayrıca, yüksek tekrarlayan inme riski ve bu durumla ilişkili genellikle kötü uzun vadeli sonuçlar, orta serebral arter tıkanıklığının yıkıcı sonuçlarını hafifletmek için hızlı ve etkili tıbbi müdahalenin önemini vurgulamaktadır.

Orta serebral arter tıkanıklığı olan hastalar için uzun vadeli prognoz nispeten kötüdür ve ölüm oranları %80'e kadar çıkmaktadır (2). Bu bireyler, 12 ay içinde %12,5 nüks oranı bildiren bir çalışma ile artmış tekrarlayan inme riski ile karşı karşıyadır (2). Orta serebral arter tıkanıklığının tetiklediği serebral kan akışı ve metabolizmasındaki derin bozulma, yıkıcı ve kalıcı nörolojik eksikliklere yol açabilir ve bu durumun uzun vadeli sonuçlarını hafifletmek için hızlı müdahalenin ve etkili yönetim stratejilerinin önemini vurgular (3).

4.2.4. İskemik Skar ve Penumbra Bölgesi

İskemik inme, beyne giden kan akışının engellenmesi sonucu geri dönüşü olmayan doku hasarına ve nörolojik bozukluğa yol açan karmaşık ve yıkıcı bir nörolojik durumdur. İskemik inmenin temel patolojik özellikleri iki farklı bölge ile karakterize edilebilir: iskemik çekirdek ve penumbra (1).

İskemik çekirdek, tipik olarak inme başlangıcından sonraki ilk birkaç saat içinde kan akışında en şiddetli ve ani azalmanın yaşandığı beyin bölgesidir. Bu bölgede, nöronlar ve glial hücreler hızla oksijen ve glikozdan mahrum kalır ve nekroz yoluyla hücre ölümüyle sonuçlanan bir dizi moleküler ve hücresele olaya yol açar (17). Bu çekirdek bölge, iskemik penumbranın hızlı bir şekilde enfarktüs çekirdeğine dönüşmesiyle karakterize edilir ve bu da hızlı bir şekilde gerçekleştirilse bile rekanalizasyonun potansiyel faydasını önemli ölçüde azaltır (18). Buna karşılık penumbra, kan akışının azaldığı ancak tamamen engellenmediği iskemik çekirdeği çevreleyen bölgedir. Penumbradaki hücreler hala canlıdır, ancak iskemik durum devam ederse hücre ölümüne ilerleme riski altındadırlar. Penumbradaki hücreler

başlangıçta işlevsel bir bozulma ve metabolik sıkıntı yaşar, ancak hemen hücre ölümüne yenik düşmezler.

İskemik çekirdek ve penumbra arasındaki ayırım, iskemik inmenin patofizyolojisini ve potansiyel terapötik müdahaleleri anlamak için çok önemlidir. İskemik penumbranın hızlı bir şekilde çekirdek infarkta dönüşmesi, hızlı bir şekilde gerçekleştirilse bile rekanalizasyonun faydasını önemli ölçüde azaltır. Sonuç olarak, penumbranın korunmasını ve infarkt çekirdeğine ilerlemesinin önlenmesini amaçlayan terapötik müdahalelerin zamanında yapılması hasta sonuçlarının iyileştirilmesi için esastır (19).

Penumbra nöronları başlangıçtaki iskemi kaynaklı hücre ölümüne yenik düşmese de, reperfüzyon sırasında apoptotik bir yola benzeyen gecikmeli bir şekilde ölmeye devam ederler (17). Bu hücrelerin ölümündeki bu gecikme, tıkalı damarın rekanalizasyonundan önce penumbranın tedavisinin düşünülmesi kritik önem taşıdığından, terapötik müdahale için bir pencere sunmaktadır (19).

İskemik çekirdek ve penumbra arasındaki farklı hasarın altında yatan hücresel mekanizmalar karmaşık ve çok faktörlüdür. İskemik çekirdekte, kan akışındaki şiddetli ve ani azalma, oksijen ve glikozun hızla tükenmesine yol açarak nekrotik hücre ölümüyle sonuçlanan bir dizi olayı tetikler. Bu, eksitotoksik yolların aktivasyonunu, serbest radikallerin üretimini ve iyon homeostazının bozulmasını içerir ve bunların hepsi iskemik çekirdekte gözlenen hızlı ve geri döndürülemez hasara katkıda bulunur.

Buna karşılık, penumbradaki hücreler daha hafif bir iskemiye maruz kalır ve bu da adaptif ve koruyucu mekanizmaların başlatılmasına olanak tanır. Bununla birlikte, kan akışının yeniden sağlanması paradoksal olarak serbest radikallerin oluşmasına ve apoptotik yolların aktivasyonuna yol açabileceğinden, bu hücreler reperfüzyon aşamasında hücre ölümüne ilerleme riski altındadır (17–20).

4.2.5. Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar

Dünya çapında önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerinden biri olan iskemik inme, temel olarak, genellikle orta serebral arterdeki bir kan pıhtısı nedeniyle beyindeki kan akışının engellenmesinden kaynaklanmaktadır (10). Serebral kan

akışındaki bu azalma, nihayetinde nöronal hasara ve ölüme yol açan karmaşık bir hücrel ve moleküler olaylar dizisini tetikler.

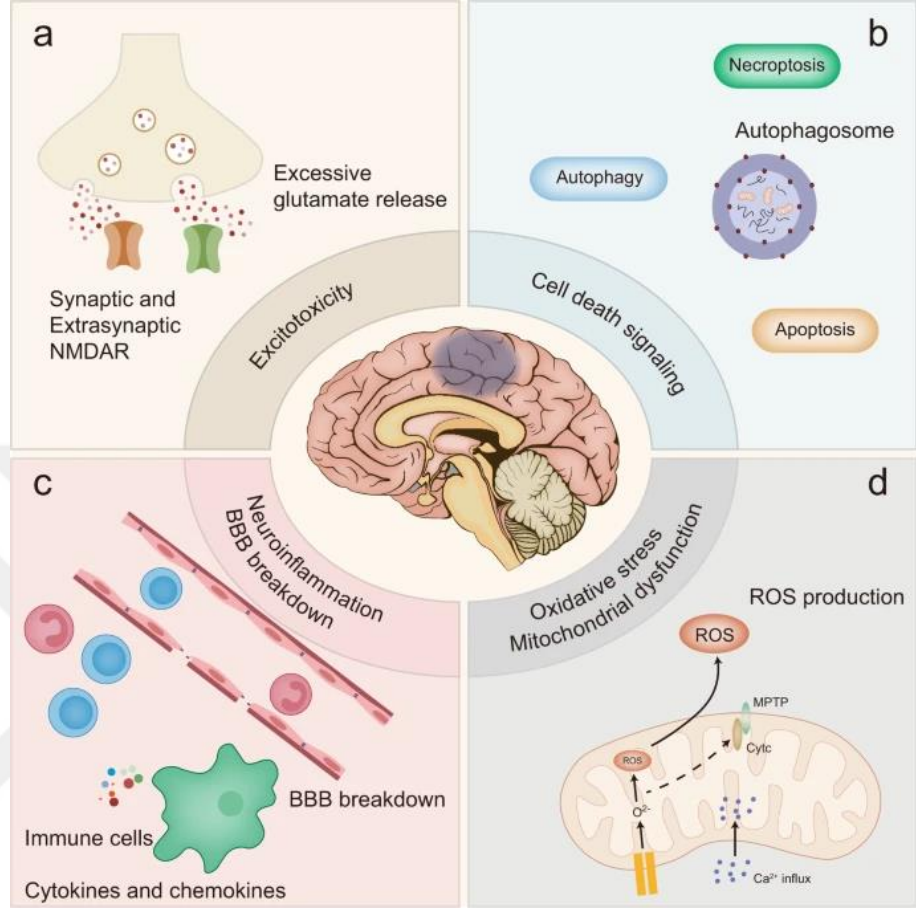
İskemik inmenin ilk aşaması, hücrelerdeki temel enerji molekülü olan ATP'de hızlı ve önemli bir düşüşle işaretlenir. Bu ATP eksikliği doğrudan oksidatif fosforilasyon yoluyla verimli ATP üretimi için vazgeçilmez olan oksijen ve glikoz tedarikindeki kesintiden kaynaklanır (21). Bu kritik hücrel enerji kaynağının kaybı, çeşitli iyon pompalarının işlevini bozarak iyon homeostazında bir dengesizlik ve ardından etkilenen beyin bölgesi boyunca hücre zarlarının depolarizasyonu ile sonuçlanır (21).

Hücre membranlarının depolarizasyonu, komşu nöronlar üzerindeki reseptörlerine bağlanabilen ve onları aşırı uyarabilen uyarıcı nörotransmitter glutamatın salınmasına neden olur (21). Bu glutamat aracılı eksitotoksiste, hücrelere önemli miktarda kalsiyum iyonu akışına yol açarak iyonik homeostazı daha da bozar ve bir dizi zararlı sinyal yollarını aktive eder. Bu, hücrel bileşenlere ve organellere zarar verebilecek enzimlerin aktivasyonunun yanı sıra oksidatif strese ve hücrel makromoleküllerin tahribatına katkıda bulunan reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini de içerir (21).

Kalsiyum düzensizliği, hücrel bileşenlere ve organellere zarar verebilecek proteazlar, lipazlar ve nükleazlar gibi çok sayıda enzimi aktive ettiği için iskemik inmede önemli bir olaydır. Ayrıca, aşırı kalsiyum reaktif oksijen türlerinin üretiminin artmasına yol açarak oksidatif strese neden olur ve proteinler, lipitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücrel makromoleküllerin bozulmasına katkıda bulunur (17). Hücrel homeostaz ve bütünlüğün bu şekilde bozulması, iskemik inmede gözlenen nöronal hasar ve ölümün kritik bir itici gücüdür (21).

İskemik olaya yanıt olarak, enflamatuar süreçler uyarılır ve mikroglia ve lökositler gibi bağışıklık hücrelerinin etkilenen beyin bölgesine toplanmasına ve sızmasına neden olur (22). İnfiltrasyon yapan bu hücreler daha sonra sitokinler ve kemokinler de dahil olmak üzere doku hasarını daha da kötüleştirebilecek bir dizi inflammatuar aracı salgılar. Ek olarak, aktive olmuş enflamatuar yanıt serbest radikallerin ve proteazların salınmasını gerektirerek oksidatif stresin artmasına ve hücrel bileşenlerin bozulmasına yol açar. Bu enflamatuar kaskad, ilk hasarı

büyütmede ve hasarı çevredeki sağlıklı dokuya yaymada kritik bir rol oynar (10,21,22).



Şekil 4.2.2: İskemik inmede görülen temel patofizyolojik süreçlerin kısa bir özeti. (a) Eksitotoksisite: İskemik ortamda aşırı glutamat salınımı hem sinaptik hem de ekstrasinaptik NMDAR'ların aşırı uyarılmasına neden olur. (b) Hücre ölümü: İskemik inme sırasında otofaji, apoptoz ve nekroptoz gibi hücre ölümüne yol açan sinyal yolları devreye girer. (c) Nöroinflamasyon ve BBB bozulması: İmmün hücrelerin, chemokin ve sitokinlerin salınımının artması kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü zayıflattır. (d) Oksidatif stres: ROS üretimi, mitokondriyal kalsiyum akışı ve mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (MPTP) devreye girmesi, iskemik koşullarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve oksidatif hasara neden olur. (23).

ATP eksikliği, glutamat eksitotoksisitesi, kalsiyum dengesizliği, oksidatif stres ve enflamatuar tepkilerin kümülatif etkileri apoptotik yolları başlatarak etkilenen nöron ve glial hücrelerin programlı hücre ölümüyle sonuçlanır. DNA parçalanması,

membran kanaması ve kaspaz enzim aktivasyonu ile işaretlenen bu kaskad, iskemik inmenin ardından hasarın yayılmasını kısıtlamak ve doku onarımını teşvik etmek için kritik bir süreç olan hasarlı hücrelerin sistematik olarak parçalanması ve uzaklaştırılmasıyla sonuçlanır.

4.2.6. Kan-Beyin Bariyeri Disfonksiyonu

Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin homeostazının korunmasında hayati bir rol oynayan nörovasküler ünitenin kritik bir bileşenidir. Merkezi sinir sistemi ile periferik bağışıklık sistemi arasındaki bu özel arayüz, özellikle nöroinflamatuvar süreçler sırasında hücrelerin, moleküllerin ve diğer maddelerin dolaşım ile beyin parankimi arasındaki hareketini düzenlemek için gereklidir(24). KBB, oksijen, karbondioksit ve hormonlar gibi küçük lipofilik moleküllerin pasif difüzyonuna izin verirken, glikoz ve amino asitler gibi temel besin maddelerini seçici ve aktif bir şekilde beyne taşıyan oldukça seçici ve yarı geçirgen bir bariyer olarak işlev görür(24,25). Ayrıca, endotel hücrelerini birbirine mühürleyen sıkı bağlantı proteinleri, potansiyel olarak zararlı kan dolaşımını maddelerinin merkezi sinir sistemine girmesini kısıtlayarak uygun sinir fonksiyonu için gerekli sinirsel ortamı korur (25).

KBB, son derece seçici ve yarı geçirgen bir arayüz oluşturmak için birlikte çalışan endotel hücreleri, perisitler ve astrositik uç ayaklardan oluşan karmaşık ve son derece özelleşmiş bir yapıdır (26). Bu bariyer, oksijen, karbondioksit ve hormonlar gibi küçük lipofilik moleküllerin pasif difüzyonunu sağlarken, glikoz ve amino asitler de dahil olmak üzere temel besin maddelerini seçici ve aktif bir şekilde beyin parankimine taşıyarak beynin hassas homeostazının korunmasında çok önemli bir rol oynar (26). Ayrıca, endotel hücrelerini bir arada tutan sıkı bağlantı proteinleri, potansiyel olarak zararlı kan kaynaklı maddelerin merkezi sinir sistemine girmesini kısıtlayarak uygun sinir fonksiyonu ve iletimi için gerekli sinirsel ortamı korur (26).

Orta serebral arterin tıkanması gibi iskemik bir olay sırasında, normalde sağlam ve son derece seçici olan KBB tehlikeye girer ve beyin hasarını şiddetlendiren bir dizi zararlı olaya yol açar. KBB'nin bozulması geçirgenliğin artmasıyla sonuçlanır ve kan kaynaklı moleküllerin, enflamatuvar hücrelerin ve suyun beyin parankimine akmasına izin verir (24,27). KBB'nin bütünlüğündeki bu bozulma, beyin ödeminin

gelişmesine katkıda bulunur ve bu da daha sonra kafa içi basıncının artmasına, kitle etkisine ve daha fazla nöronal hasara yol açabilir (24). Periferik moleküllerin ve hücrelerin beyne akması, pro-enflamatuar araçların salınmasına ve mikroglia ve astrositlerin aktivasyonuna yol açan güçlü bir nöro-enflamatuar yanıtı tetikleyebileceğinden, bu KBB disfonksiyonunun etkileri derindir.

Bu enflamatuar kaskad da ilk iskemik hasarı güçlendirerek ek nöron ölümüne ve KBB'nin daha fazla bozulmasına neden olabilir. Bariyerin bozulması serbest radikaller, enflamatuar araçlar ve eksitotoksinler gibi potansiyel olarak nörotoksik maddelerin beyne geçişine izin verdiğinden, bu kendi kendini devam ettiren hasar döngüsü nihayetinde genel beyin hasarını daha da kötüleştirir, ilk iskemik hakareti daha da şiddetlendirir ve nöronal hasar ve hücre ölümünün ilerlemesine katkıda bulunur (24,27).

Ek olarak, MCAO sırasında KBB'nin bozulması, hayati besinlerin seçici olarak taşınması ve atık ürünlerin uzaklaştırılması ciddi şekilde tehlikeye girdiğinden, beyin homeostazı sürdürme yeteneğini önemli ölçüde bozar. KBB bütünlüğündeki bu kayıp aynı zamanda serbest radikaller, enflamatuar araçlar ve eksitotoksinler gibi potansiyel nörotoksik maddelerin beyne geçişine izin vererek ilk iskemik hakareti daha da şiddetlendirebilir ve nöronal hasar ve hücre ölümünün ilerlemesine katkıda bulunabilir (24). Ayrıca, KBB'nin bozulması beyin mikro çevresinin hassas dengesini bozarak iyonik dengesizliklere, oksidatif strese ve nihayetinde genel beyin hasarını kötüleştiren bir dizi patolojik sürece yol açar (25–27).

4.2.7. Reperfüzyon Hasarı

İskemik inme, beyne giden kan akışının kesilmesiyle karakterize, nöron ölümüne ve uzun süreli fonksiyonel eksikliklere yol açan yıkıcı bir durumdur. Reperfüzyon olarak bilinen bir süreç olan kan akışının yeniden sağlanması, inme tedavisinde kritik bir hedefdir. Ancak bu süreç, reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bir olgu olan doku hasarını paradoksal olarak şiddetlendirebilir (10,28).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, reperfüzyon hasarının altında yatan merkezi bir mekanizmadır (17). İskemi sırasında oksijen eksikliği, hücrelere doğrudan zarar verebilen süperoksit ve hidrojen peroksit gibi metabolik yan ürünlerin

birikmesine yol açar. Reperfüzyonun ardından, oksijenli kanın yeniden verilmesi ROS üretimini daha da artırarak beynin antioksidan savunmasını alt eder ve nihayetinde nöronal ölümle sonuçlanan bir dizi olayı tetikler (10,28,29).

Oksidatif strese ek olarak reperfüzyon da güçlü bir enflamatuar yanıt başlatır. Kan akışının yeniden sağlanması, aktive olan ve litik enzimler ile proinflamatuar araçlar salgılayan nötrofilleri de beraberinde getirir (28). Bu enflamatuar faktörler kan-beyin bariyerini bozabilir, ödem oluşumunu teşvik edebilir ve nöronal hasarı şiddetlendirebilir (10,28).

Enflamatuar kaskad, yerleşik mikrogliaların aktivasyonu ve makrofajlar ve lenfositler gibi ek immün hücrelerin yaralanma bölgesine alınmasıyla daha da güçlenir (28). Bu hücreler apoptozu, nekrozu tetikleyebilen ve nöronal rejenerasyonu engelleyebilen çeşitli enflamatuar sitokinler, kemokinler ve diğer sinyal molekülleri salgılar (10,28,29).

Sonuç olarak, reperfüzyon sırasında oksidatif stres ve inflamasyonun kombinasyonu, iskemik inme sonrasında nöronal sağkalımı ve iyileşmeyi önemli ölçüde bozabilen karmaşık ve çok yönlü bir hasar sürecine yol açmaktadır. Reperfüzyon hasarının altında yatan kesin mekanizmaların anlaşılması, bu yıkıcı fenomeni hafifletmeyi ve hasta sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlayan hedefli terapötik müdahalelerin geliştirilmesi için çok önemlidir.

4.2.8. Nörolojik Fonksiyonlardaki Değişiklikler

Orta serebral arter tıkanıklığı, önemli nörolojik ve fonksiyonel bozukluklara yol açabilen yıkıcı bir klinik durumu temsil eder. Spesifik belirtiler, oklüzyonun kesin yeri ve ciddiyetinin yanı sıra kan akışının geri kazanılma hızına da bağlıdır (7). Tüm inmelerin yaklaşık %80'i iskemik kökenlidir ve serebral iskemi sıklıkla beynin seçici bölgelerine kan akışını kısıtlayan karotid arter stenozundan kaynaklanır (7).

Orta serebral arter tıkanıklığı olan bireyler için prognoz nispeten olumsuzdur ve ölüm oranları %80'e kadar ulaşmaktadır (2). Akut iskemik ataktan kurtulan hastalar, yüksek tekrarlayan inme riski de dahil olmak üzere uzun vadede önemli sekellerle karşı karşıya kalabilir (2).

Motor defisitler, orta serebral arter oklüzyonunun yaygın bir sonucudur ve şiddeti lezyonun kesin konumuna bağlıdır. Motor korteks sıklıkla etkilendiğinden, kontralateral hemipleji veya hemiparezi sık görülen bir tablodur. Dikkat, hafıza ve yürütme işlevindeki eksiklikleri kapsayan bilişsel bozukluklar da yaygın olarak gözlenmektedir (30).

Orta serebral arter oklüzyonu ile ilişkili nörolojik ve fonksiyonel bozuklukların değerlendirilmesi, tedavi ve rehabilitasyon stratejilerine rehberlik etmek için çok önemlidir (31). Ulusal Sağlık Enstitüleri İnme Skalası gibi standartlaştırılmış nörolojik skorlama sistemleri nörolojik defisitlerin şiddetini ölçmek için kullanılabilir. Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans anjiyografi dahil olmak üzere tanısal görüntüleme teknikleri de orta serebral arter tıkanıklığının ilerlemesini tanımlamak ve izlemek için temel araçlardır (2).

Orta serebral arter tıkanıklığı olan bazı hastalarda, beyin ödemi ve ilerleyici nörolojik bozulma ile karakterize, genellikle tıbbi müdahaleye dirençli olan malign serebral enfarktüs gelişebilir. Bu vakalarda, dekompresif cerrahi, yükselen kafa içi basıncını durdurmayı ve daha fazla nörolojik hasarı önlemeyi amaçlayan hayat kurtarıcı bir müdahaleyi temsil edebilir (2,7,31,32).

4.2.9. MCAO ile İlişkili Uzun Dönem Etkiler

Orta serebral arter oklüzyonu, iskemik inmenin yaygın ve yıkıcı bir şeklidir ve önemli nörolojik defisitlere ve uzun vadeli sonuçlara neden olur. Nöronal ölüm, glial aktivasyon ve beyin ağlarının bozulması ile karakterize edilen post-iskemik nörodejenerasyon, bu durumun ayırt edici özelliğidir (3). Ancak, beynin olağanüstü iyileşme ve plastisite mekanizmaları hedefe yönelik rehabilitasyon yoluyla kullanılabilir (3).

Orta serebral arter tıkanıklığının doğal seyri, yüksek tekrarlayan inme riski ve önemli mortalite ile belirgindir. Majör sakatlayıcı inme geçiren hastaların sonuçları genellikle kötüdür ve ölüm oranları %80'e kadar çıkmaktadır (2). Uzun vadeli prognoz, ilk yıl içinde %12,5'e varan tekrarlayan inme riski ile nispeten kötüdür (2). Serebral

iskeminin sonuçları bireyi, sosyal çevresini ve bir bütün olarak toplumu derinden etkileyebilir (3).

İlk iskemik hasar nöron ölümüne ve beyin fonksiyonlarının bozulmasına yol açarken, beyin plastisite olarak bilinen bağlantıları yeniden düzenleme ve yeniden kurma konusundaki olağanüstü yeteneği fonksiyonel iyileşmeyi destekleyebilir. Fiziksel, mesleki ve konuşma terapisi gibi rehabilitasyon stratejileri bu plastisiteyi kullanabilir ve uzun vadeli sonuçları iyileştirebilir (33). Bu müdahaleler, nöral onarımı teşvik etmeyi, nöroplastisiteyi artırmayı ve beyin adaptasyon ve yeniden düzenleme için doğal kapasitesini devreye sokarak kaybedilen işlevi geri kazanmayı amaçlamaktadır (33).

Ekstrakraniyal-intrakraniyal bypass cerrahisi gibi cerrahi revaskülarizasyon prosedürleri, serebral hemodinamiyi iyileştirmek ve sonraki inme riskini azaltmak için bir araç olarak araştırılmıştır. Ancak bu müdahaleler risksiz ve komplikasyonsuz değildir. Bu baypas ameliyatlarının etkinliği bildirilmiştir, ancak dikkatli bir değerlendirme gerektiren çeşitli komplikasyonlarla da ilişkilendirilmiştir (34).

Nöroprotektif ajanlar ve hücre bazlı tedaviler gibi yeni tedavi stratejileri, orta serebral arter oklüzyonunun uzun vadeli etkilerini hafifletme konusunda umut vaat etmektedir. Reperfüzyonun tetiklediği oksidatif stres ve enflamatuar tepkileri hedef alan nöroprotektif ajanlar ikincil nöronal hasarı en aza indirmeye yardımcı olabilir (35). Kök hücre nakli de dahil olmak üzere hücre bazlı tedaviler nöronal rejenerasyonu, anjiyogenezi ve büyüme faktörlerinin sistem salınımını teşvik ederek beyin doğal iyileşme mekanizmalarını destekleyebilir.

Sonuç olarak, orta serebral arter oklüzyonu, önemli uzun vadeli sonuçları olan yıkıcı bir iskemik inme şeklidir. Post-iskemik nörodejenerasyon önemli bir endişe kaynağı olsa da, beyin plastisite ve iyileşme için olağanüstü kapasitesi kapsamlı rehabilitasyon stratejileri ile kullanılabilir. Nöroproteksiyon ve nöral rejenerasyonu hedefleyen yeni terapötik yaklaşımlar, uzun vadeli sonuçları iyileştirmek ve bu yıkıcı durumun yükünü azaltmak için umut vermektedir.

4.3. GPR88 Proteini

4.3.1. GPR88'in Moleküler Biyolojisi ve Genetik Temelleri

GPR88 (G Protein-Bağlı Reseptör 88) proteini, hormonlar, nörotransmitterler ve diğer sinyal molekülleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücre dışı sinyallere hücrel tepkilere aracılık etmede önemli bir rol oynayan geniş ve çeşitli bir transmembran reseptör grubu olan G protein-bağlı reseptör süper ailesinin bir üyesidir (36). GPR88 proteinini kodlayan GPR88 geni, insanlarda kromozom 16 üzerinde bulunur ve öncelikle merkezi sinir sisteminde, özellikle de motor kontrol ve ödülle ilgili davranışlarda rol oynayan striatumda ifade edilir (36).

GPR88 proteini 370 amino asitten oluşur ve G proteinine bağlı reseptörlere özgü karakteristik yedi transmembran alan yapısını benimser (36). GPR88 proteininin hücre dışı bölgesi, birçok sitokin reseptöründe bulunan sitokin bağlayıcı modülün ortak özellikleri olan korunmuş bir sistein bakımından zengin alan ve bir WSXWS motifi içerir (37). Ek olarak, GPR88 proteininin sitoplazmik bölgesi, Janus ailesi tirozin kinazların bağlanması ve ardından aşağı akış sinyal yollarının aktivasyonu için önemli olduğu düşünülen korunmuş prolin bakımından zengin diziler ve birkaç tirozin kalıntısı içerir (38,39).

GPR88 geninin ifadesi ve düzenlenmesi, karmaşık transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmaları içeren sıkı bir şekilde kontrol edilir. Örneğin, GPR88 geni, çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından bağlanabilen ve böylece gen transkripsiyon oranını modüle eden promotör bölgeler ve güçlendiriciler gibi çeşitli düzenleyici unsurlar içerir (40). Ayrıca, GPR88 mRNA transkriptinin stabilitesi ve translasyonu, GPR88 proteininin üretimini artırabilen veya baskılayabilen çeşitli RNA bağlayıcı proteinler ve mikroRNA'lardan etkilenebilir (36,41).

GPR88 reseptörünün aşağı akışındaki sinyal mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır, ancak $G\alpha$ alt birimleri gibi heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyonunu içerdiklerine inanılmaktadır, bu da daha sonra ikincil habercilerin modülasyonu, gen ifadesinin düzenlenmesi ve çeşitli fizyolojik süreçlerin kontrolü dahil olmak üzere bir dizi hücre içi sinyal olayını tetikleyebilir (37,41).

4.3.2. GPR88'in Beyindeki Dağılımı ve Ekspresyon Profili

G proteinine bağı bir reseptör olan GPR88, seçici ifadesi ve beyindeki farklı dağılımı nedeniyle çeşitli nörolojik süreçleri ve bozuklukları araştırmak için umut verici bir konu olarak ortaya çıkmıştır. Kapsamlı çalışmalar, GPR88'in özellikle striatumdaki lokalizasyon ve ekspresyon modellerini ve nöral devrelerin düzenlenmesindeki potansiyel rollerini ortaya çıkarmıştır (40).

GPR88'in gelişimsel ve yetişkin ifade profilleri sıçan beyinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (42). GPR88 merkezi sinir sisteminde, özellikle de hem dopamin reseptörü D1- hem de D2-eksprese eden orta dikenli nöronlarda (6) bulunduğu striatumda bol miktarda eksprese edilir (42). Ek olarak, GPR88 korteks, hipokampus ve serebellum da dahil olmak üzere diğer beyin bölgelerinde tespit edilmiştir, bu da çeşitli nöral fonksiyonlara dahil olduğunu göstermektedir (6,42).

Striatum içinde GPR88, ventral striatuma kıyasla dorsal striatumda daha yüksek ekspresyon ile heterojen bir dağılım sergiler (43). Gelişmekte olan sıçan striatumunda GPR88'in spatiotemporal ifadesi, ifadesinin doğum sonrası gelişim sırasında arttığını ve yetişkinlikte zirveye ulaştığını gösterir (42).

GPR88'in striatal dopamin sistemindeki modülatör rolü vurgulanmış ve çeşitli psikiyatrik bozukluklar için terapötik bir hedef olma potansiyeline işaret edilmiştir. GPR88 eksikliği, nöropsikiyatrik hastalıkların karakteristik bir özelliği olan değişmiş duyusal-motor geçitleme ile ilişkilendirilmiştir (44).

Ayrıca, çalışmalar GPR88'in sadece hücre yüzeyinde değil, aynı zamanda çekirdek içinde de ekspresyonu ile subselüler lokalizasyonunu ortaya çıkarmış ve potansiyel klasik olmayan GPCR etki modlarını düşündürmüştür. Bu bulgular, GPR88'in sinir devrelerindeki işlevsel önemi ve nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların patofizyolojisiyle ilgisi hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır(6,42–44).

4.3.3. GPR88'in Fizyolojik Roller

Yetim G-protein bağı reseptör 88 olarak da bilinen GPR88, merkezi sinir sistemindeki çeşitli fizyolojik süreçlere karmaşık katılımı nedeniyle sinirbilimde büyük ilgi görmüştür. Ağırlıklı olarak striatumda eksprese edilen bu reseptör, motor

fonksiyon, duygusal düzenleme ve bilişsel yeteneklerin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (45).

Kapsamlı araştırmalar, GPR88'in striatumdaki dağılımını ve düzenlenmesini incelemiş ve potansiyel işlevsel rolleri hakkında değerli bilgiler sağlamıştır (6). Gelişimsel çalışmalar, sıçan striatumunda GPR88'in spatiotemporal ekspresyonunu ortaya çıkarmış ve sırasıyla motor ve bilişsel işlevler için çok önemli olan hem nigrostriatal hem de kortikostriatal yollara dahil olduğunu düşündürmüştür (6).

Deneysel ve klinik araştırmalar, GPR88'in sinirsel işleyişteki çeşitli rollerini daha da aydınlatmıştır. GPR88 geninden yoksun fareler, artan hareketlilik, artan stereotipiler ve motor koordinasyon ve öğrenmede eksiklikler sergileyerek, reseptörün motor kontrolünü düzenlemedeki önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, farelerde GPR88 geninin tamamen silinmesi, yeni ortamlara uyum sağlayamama ve anksiyete benzeri davranışların azalması ile ilişkilendirilmiştir, bu da duygusal düzenlemeye dahil olduğunu göstermektedir (4). İlginç bir şekilde, GPR88'in striatal dopamin fonksiyonundaki modülatör rolü, çeşitli psikiyatrik bozuklukların tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (43). GPR88'in D1R tipi ve D2R tipi orta dikenli nöronlardaki farklı rolleri, duygusal ve motor davranışların farklı düzenlemesini ortaya çıkararak daha da aydınlatılmıştır.

Toplu olarak, deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, GPR88'in merkezi sinir sistemindeki çok yönlü fizyolojik rollerinin altını çizmekte ve motor kontrol, duygusal düzenleme ve bilişsel süreçlerdeki önemini vurgulamaktadır (4,6,43,44).

4.3.4. GPR88 ve Patolojik Durumlarla İlişkisi

GPR88, motor kontrol, biliş ve motivasyon için kritik bir beyin bölgesi olan striatumda bol miktarda ifade edilir (4). Biriken kanıtlar, GPR88'in Parkinson hastalığı, şizofreni ve serebral iskemi gibi durumların patofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir (43,44,46).

Çalışmalar, GPR88'in yokluğunun striatumun birincil çıkış nöronları olan orta dikenli nöronların aktivitesini artırabileceğini ortaya koymuştur (44). Nöronal aktivitedeki bu değişiklik, hayvan modellerinde motor ve işarete bağlı davranışlardaki

değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (44). Ayrıca, GPR88 eksikliğinin duyuşal-motor geçişi etkilediği gösterilmiştir, bu da nöropsikiyatrik bozukluklarda potansiyel bir katılıma işaret etmektedir (44).

Parkinson hastalığında araştırmacılar, GPR88 ekspresyonunun etkilenen hastaların striatumunda önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır (46). İlginç bir şekilde, hayvan modellerinin ilişkisel striatumunda GPR88'in hedefli olarak baskılanması, apati, depresyon ve bilişsel bozukluk dahil olmak üzere Parkinson hastalığıyla ilişkili psikiyatrik semptomları hafifletebilmiştir (46).

GPR88'in striatal dopamin işlevindeki modülatör rolü, çeşitli psikiyatrik bozukluklar için yeni tedaviler geliştirmek için umut verici bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (43). Örneğın, bir şizofreni fare modelinde, GPR88'in aktivasyonunun, potansiyel olarak dopaminerjik sistemin düzenlenmesi yoluyla psikoz benzeri davranışları hafiflettiği bulunmuştur (45).

GPR88'in striatumdaki farklı nöronal alt popülasyonların işlevini etkilediği mekanizmaları ve bu değişikliklerin nörolojik bozuklukların ortaya çıkmasına nasıl katkıda bulunduğunu tam olarak aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

4.3.5. GPR88'in Serebral İskemideki Potansiyel Rolü

Beyne giden kan akışının azalmasıyla karakterize bir durum olan serebral iskemide, yıkıcı nörolojik sonuçlara yol açabilir. Beynin iskemik etkilere verdiği yanıtı yöneten altta yatan mekanizmaları anlamak, etkili terapötik müdahaleler geliştirmek için çok önemlidir (1). Bu bağlamda giderek daha fazla dikkat çeken ilgi çekici bir hedef, yetim G-protein-bağlı reseptör GPR88'dir.

Kapsamlı araştırmalar, GPR88'in serebral iskemide potansiyel katılımı hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. GPR88'in, iskemik hasara karşı özellikle savunmasız bir beyin bölgesi olan striatumda yüksek oranda ifade edildiği bilinmektedir (6). GPR88'in gelişimsel ve yetişkin ifade kalıpları, kortikal gelişim ve psikiyatrik bozukluklarda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (42). Ayrıca, alışmalar farelerde Gpr88 geninin silinmesinin hiperlokomosyona, artan stereotiplere ve motor koordinasyon ve öğrenmede eksikliklere yol açabileceğini

göstermiştir (4). Bu davranışsal değişiklikler, GPR88'in motor fonksiyonun önemli bir düzenleyicisi olabileceğini ve bozulmuş bazal ganglion fonksiyonu ile ilişkili nörolojik bozuklukların patofizyolojisine potansiyel olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir. İlginç bir şekilde, GPR88'in etkileri iki ana striatal nöronal alt tipte, doğrudan ve dolaylı yol orta dikenli nöronlarda farklı görünmektedir (4). Özellikle, GPR88'in D1R tipi ve D2R tipi orta dikenli nöronların işlevini modüle etmede farklı roller oynadığı ve böylece duygusal ve motor davranışları farklı şekilde düzenlediği görülmektedir (4).

GPR88'in striatumdaki stratejik konumu ve motor ve psikiyatrik semptomlara potansiyel katılımı göz önüne alındığında, GPR88'in serebral iskeminin altında yatan patojenik süreçlerde de rol oynayabileceği akla yatkındır. Deneysel çalışmalar, GPR88'in iskemik beyin hasarındaki potansiyel rolüne ışık tutmaya başlamıştır (4,43,44,46).

4.3.6. GPR88'i Hedef Alan Terapötik Yaklaşımlar

Farmakolojik stratejiler, GPR88'e özgü agonist ve antagonistlerin tanımlanması ve geliştirilmesine odaklanmıştır. Son çalışmalar, GPR88 reseptöründe umut verici aktivite gösteren 2-PCCA, RTI-13951-33 ve fenilglisinol türevleri gibi çeşitli bileşiklerin keşfedildiğini bildirmiştir (5). Bu bileşikler, nörolojik bozuklukların tedavisi için ilaç adayları olarak daha fazla optimizasyon ve geliştirme potansiyeline sahiptir.

Farmakolojik müdahalelere ek olarak, GPR88 ifadesini modüle etmek için gen terapisi yaklaşımları araştırılmıştır. Araştırmacılar, hedeflenen beyin bölgelerinde GPR88 ifadesini artırabilen veya baskılayabilen genetik materyali iletmek için viral vektörlerin, özellikle de lentiviral vektörlerin kullanımını araştırmışlardır (4). Lentiviral vektörler, nöronlar gibi bölünmeyen hücreleri verimli bir şekilde transdükleme ve uzun süreli transgen ekspresyonu sağlama yetenekleri sayesinde gen tedavisinde çok yönlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu vektörler, GPR88'in çeşitli davranışsal ve nörolojik süreçlerdeki rolünü incelemek ve GPR88 ifadesini modüle etmenin terapötik potansiyelini araştırmak için kullanılmıştır (5).

GPR88'in striatal dopamin işlevindeki modülatör rolü, motor ve duygusal düzensizlikle ilgili olanlar da dahil olmak üzere psikiyatrik bozuklukların tedavisi için umut verici bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (43). Devam eden araştırmalar, GPR88'in farmakolojisini ve sinyal yollarını daha da aydınlatmanın yanı sıra daha güçlü ve seçici ligandlar ve gen terapisi yaklaşımları geliştirmeye odaklanmıştır(5).

4.3.7. Literatürde GPR88 ile İlgili Çalışmalar

Literatür, GPR88'in motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçlerde yer alan önemli bir beyin bölgesi olan striatumdaki D1R eksprese eden ve D2R eksprese eden orta dikenli nöronların işlevini modüle etmede farklı roller oynadığını göstermektedir (4).

Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar, GPR88'in nörolojik araştırmalardaki önemine ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır. GPR88 geninin ifadesi çeşitli antidepresan tedaviler ve farmakolojik müdahalelerle değiştirilir ve hem glutamat hem de dopamin tarafından indüklenir, bu da bir dizi nöropsikiyatrik bozuklukta potansiyel katılımını vurgular (43,44). GPR88'den yoksun fareler hiperlokomosyon, artan stereotipler, motor koordinasyon ve öğrenme eksikliklerinin yanı sıra yeni ortamlara alışmama ve anksiyete benzeri davranışlarda azalma göstererek reseptörün duygusal ve motor davranışları düzenlemede kritik rol oynadığını düşündürmektedir (4,6,43).

Daha ileri çalışmalar, GPR88'in striatumdaki uzamsal ve zamansal ekspresyon modellerine ilişkin içgörüler sağlamış ve hem D1R eksprese eden hem de D2R eksprese eden orta dikenli nöronlardaki lokalizasyonunu ortaya çıkarmıştır (4). Bu bulgular, GPR88'in bu nöronal alt tiplerin işlevini farklı şekilde modüle edebileceğini ve Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, bipolar bozukluk, şizofreni ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu gibi değişmiş bazal ganglion işlevini içeren nörolojik bozuklukların karmaşık patofizyolojisine potansiyel olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir (4,43,44,46).

GPR88'in striatal dopamin fonksiyonundaki düzenleyici rolü, nörolojik bozukluklarla ilişkili psikiyatrik semptomların tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Farklı striatal hücre tiplerinde GPR88 tarafından düzenlenen kesin sinyal yollarını aydınlatmak ve çeşitli nörolojik ve psikiyatrik

durumlar bağlamında terapötik potansiyelini daha fazla keşfetmek için ek araştırmalara ihtiyaç vardır.



5. MATERYAL METOT

5.1. Deney Planı ve Deney Grupları

Bu proje kapsamında GPR88'in 30 ve 60 dakikalık serebral iskemi modelindeki rolünü araştırmayı amaçladık. Meydana gelen serebral iskemi vakalarının yaklaşık %85'i orta serebral arterin tıkanması sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle, bu proje kapsamında farelerde serebral iskemi modeli olarak orta serebral arter tıkanması metodu seçilmiştir (47).

Projenin belirlenen hedeflerine ulaşabilmesi için aşağıda belirtilen deney grupları oluşturulmuş ve her bir grup için her MCAO modeli (30 dakika ve 60 dakika) kapsamında n=10 olmak üzere toplam 80 hayvan kullanılmıştır:

Lv-GFP: Moleküler klonlamaların yapıldığı pLenti-EF1 α -GFP-2A-Puro vektörünün fare beyninde herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılabilmesi için oluşturulmuş deney grubudur. Bu grup için 30 dakika MCAO modelinde n=10, 60 dakika MCAO modelinde ise n=10 hayvan dağıtılmıştır.

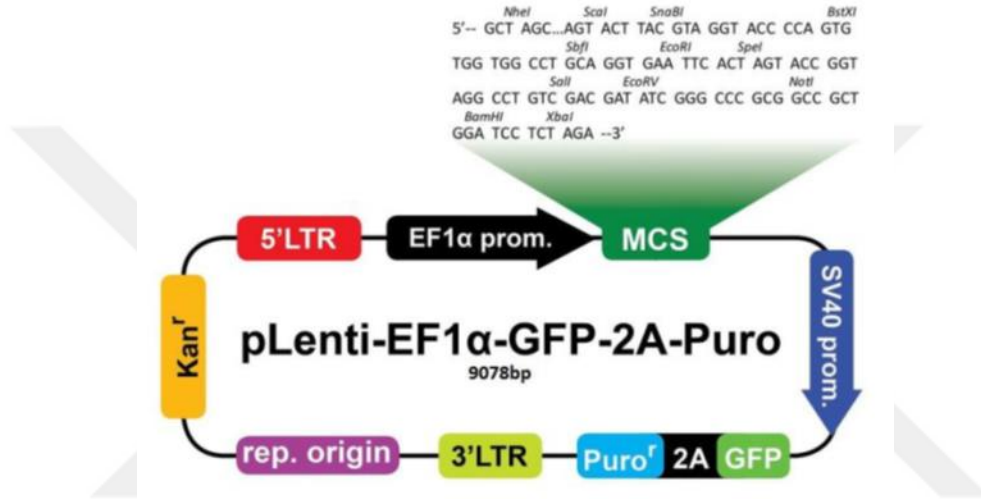
Lv-GPR88: pLenti-EF1 α -GFP-2A-Puro vektörünün içerisine klonlanmış GPR88'in protein kodlama bölgesi sayesinde GPR88 aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulmuş deney grubudur. Bu grup için 30 dakika MCAO modelinde n=10, 60 dakika MCAO modelinde n=10 hayvan kullanılmıştır.

ScRNA: Lentiviral pLVTHM plazmidinin fare beyninde herhangi bir etkisinin olup olmadığının analizi için, içerisine fare genomunda herhangi bir geni hedef

almayan gen dizisi yerleştirilmiş kontrol grubudur. Bu grup için 30 dakika MCAO modelinde n=10, 60 dakika MCAO modelinde n=10 hayvan yer almıştır.

Sh-GPR88: GPR88 gen dizisini hedef alarak GPR88 protein seviyesinin azaltılmasının hedeflendiği deney grubudur. Bu grup için 30 dakika MCAO modelinde n=10, 60 dakika MCAO modelinde ise n=10 hayvan dağıtılmıştır.

Bu şekilde, toplamda 4 grup ve her grup için iki farklı MCAO modeliyle birlikte çalışmanın hedeflerine uygun hayvan dağılımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1.1: pLenti-EF1α-GFP-2A-Puro plazmidinin genel yapısı (<https://www.abmgood.com/vectormap/index/index/?name=pLenti-EF1a-GFP-2A-Puro>).

Bunun için insan GPR88 geninin kodlama bölgesi (NCBI referans numarası: NM_022049.3) Şekil 5.1.1'de belirtilen lentiviral vektörlere klonlanmıştır.

5.2. Moleküler Klonlama Çalışmaları

5.2.1. Lentiviral vektör

Hem in vitro hem de in vivo koşullara uygun şekilde GPR88 protein seviyesini artırmak amacıyla bir lentiviral vektör kullanılmıştır. Bu lentiviral vektör, GPR88 proteininin yanı sıra gfp proteininin de ifadesine imkân tanıyan bisistronik bir yapıya sahiptir.

5.2.2. Hücre hattından toplam RNA izolasyonu

HeLa hücre hattından toplam RNA izolasyonu, High Pure RNA Isolation Kit (11828665001; Roche, İsveç) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için yaklaşık 10^6 hücre kullanılmıştır. Besi ortamından ayrılan hücreler 200 µl PBS içerisinde süspansiyon edildikten sonra, kitin lizis solüsyonu eklenerek vorteks yardımıyla parçalanmıştır. Devamında, kitin protokolünde belirtilen yıkama, santrifüj ve diğer aşamalar filtrelili tüpler kullanılarak sırasıyla uygulanmıştır. Son aşamada elüsyon solüsyonu ile toplam RNA elde edilmiştir. İzole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu P300 (Implen, Almanya) nanofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

5.2.3. cDNA sentezi

cDNA, tamamlayıcı DNA anlamına gelmektedir. İzole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04896866001, Roche, İsveç) ile T100™ (Bio-Rad, ABD) termal döngü cihazı kullanılmıştır. Kitin protokolüne uygun olarak, reaksiyonlar 1 µg/µl RNA konsantrasyonuna sahip olacak şekilde 20 µl toplam hacimde hazırlanmıştır. Primerlerin denatürasyonu 10 dakika boyunca 65 °C'de gerçekleştirilmiş, ters transkriptaz enzimi ise 5 dakika 85 °C'de inaktive edilmiştir. Tablo 5.2.3.1 ve Tablo 5.2.3.2'de, reaksiyonda kullanılan reaktifler, bunların hacimleri ve termal döngü cihazı aşamaları ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Tablo 5.2.3.1: cDNA malzeme protokolü

| Malzemeler | Hacim (μ l) |
|---------------------------------|-----------------------------|
| Toplam RNA (1 μ g/ μ l) | değişken |
| dNTP Karışımı | 2 μ l |
| RNase İnhibitörü | 0,5 μ l |
| 5x Ters Transkriptaz Solüsyonu | 4 μ l |
| Ters Transkriptaz Enzimi | 0,5 μ l |
| Anchored Oligo dT Primerleri | 1 μ l |
| Random Primerleri | 2 μ l |
| ddH ₂ O | değişken |
| Toplam | 20 μl |

Tablo 5.2.3.2: cDNA termal döngü cihazı basamakları

| Sıcaklık (°C) | Zaman (dakika) |
|---------------|----------------|
| 65 | 10 dk |
| 50 | 60 dk |
| 85 | 5 dk |
| 4 | ∞ |

5.2.4. Primer dizaynı

İleri ve geri primer dizisi İnsan GPR88 geninin kodlama bölgesi (NCBI referans dizisi: NM_022049.3) olan Homo sapiens G protein-coupled receptor 88 (GPR88), mRNA dizisi kullanılarak tasarlanmıştır. Restriksiyon enzimleri kullanılan vektörün çoklu klonlama bölgesinden seçilmiştir. Kesim için uygun olan Sall (gTCgAC) ve XbaI (TCTAgA) restriksiyon enzim dizileri ileri ve geri primer dizilerinin başına eklenmiştir.

İleri primer (5'- AgTCAgTCgACATgACCAACTCCTCCTCCACAT-3') ve geri primer (5'- AgTCATCTAgATTACCAgTgCTggCCCgC-3') için dizileri kullanılmıştır. Primerler için uygun olan Tm değeri NEB Biolabs Tm Calculator

programı kullanılarak hesap edilmiştir. 63 °C ve 65 °C uygun Tm değerleri olarak belirlenmiştir.

The screenshot shows the NEB Biolabs Tm Calculator interface. It includes the following elements:

- Product Group:** Phusion
- Polymerase/Kit:** Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (HF Buffer)
- Primer Concentration (nM):** 500
- Primer 1:** ATGACCAACTCCTCTCCACAT
- Primer 2:** TTACCAGTGCTGGCCCGC
- Anneal at:** 66 °C
- Primer 1 details:** 22 nt, 50% GC, Tm: 63°C
- Primer 2 details:** 18 nt, 67% GC, Tm: 65°C
- Buttons:** Reset concentration, Switch to batch mode, Clear, Use example input

Şekil 5.2.1: NEB Biolabs Tm Calculator programı kullanılarak hesap edilen uygun Tm değerleri

5.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İnsan GPR88 geninin kodlama bölgesi (NCBI referans dizisi: NM_022049.3), HeLa hücrelerinden elde edilen cDNA örneği kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu Q5® High-Fidelity DNA Polymerase PCR Kit (M0491, New England BioLabs, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. PCR için primer konsantrasyonu 0,2 mM ve 0,5 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Tablo 5.2.5.1 ve Tablo 5.2.5.2’te PCR reaksiyon bileşenleri, Tablo 5.2.5.3’te ise reaksiyon adımları gösterilmektedir. PCR işlemi T100™ (Bio-Rad, ABD) termal döngü cihazında yürütülmüş, elde edilen PCR ürünleri 6X yükleme boyası (R0631; Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek %0,8 agaroz jel üzerinde 120 V’da yürütülmüştür. DNA boyutu belirlemek için 1 kb (O’GeneRuller-ready to use, Thermo Scientific, ABD) standart kullanılmıştır. Agaroz jel, Bio-Rad Chemidoc görüntüleme sistemi (1708280; Biorad Life Sciences Research, ABD) ile incelenmiş ve yaklaşık 1155 baz çifti uzunluğundaki GPR88 DNA bandı saptanmıştır.

Tablo 5.2.5.1: 0,2 mM Primer Konstrasyonu için PCR Reaksiyon Malzemeleri

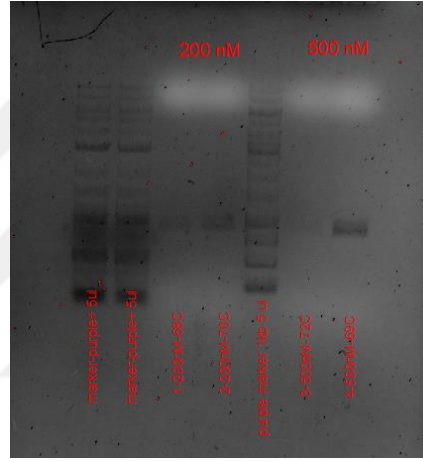
| Malzemeler | Hacim (μ l) |
|----------------------------|-------------------------------|
| cDNA | 1,0 μ l |
| İleri Primer | 0,4 μ l |
| Geri Primer | 0,4 μ l |
| Q5 Polimeraz Enzimi | 0,2 μ l |
| 5x High Fidelity Solüsyonu | 4,0 μ l |
| dNTP karışımı | 0,4 μ l |
| dH ₂ O | 13,6 μ l |
| TOPLAM | 20,0 μl |

Tablo 5.2.5.2: 0,5 mM Primer Konstrasyonu için PCR Reaksiyon Malzemeleri

| Malzemeler | Hacim (μ l) |
|----------------------------|-------------------------------|
| cDNA | 1,0 μ l |
| İleri Primer | 1,0 μ l |
| Geri Primer | 1,0 μ l |
| Q5 Polimeraz Enzimi | 0,2 μ l |
| 5x High Fidelity Solüsyonu | 4,0 μ l |
| dNTP karışımı | 0,4 μ l |
| dH ₂ O | 12,4 μ l |
| TOPLAM | 20,0 μl |

Tablo 5.2.5.3: PCR reaksiyon basamakları

| Basamaklar | Zaman | Sıcaklık |
|-------------------------|--------|----------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 30 sn | 98°C |
| Denatürasyon | 10 sn | 98°C |
| Bağlanma | 10 sn | 60-70°C |
| Uzama | 60 sn | 72°C |
| Son Uzama | 120 sn | 72°C |
| Bitiş | ∞ | 4°C |



Şekil 5.2.2: PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

5.2.6. Agaroz jelden DNA izolasyonu

Agaroz jelde tespit edilen GPR88 PCR ürünleri, Zymo Clean & Gel DNA Recovery Kit (D4007, Zymo, ABD) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla, agaroz jelden GPR88 DNA bantları kesilip alınmış ve bant kütlesinin yaklaşık üç katı kadar kitte bulunan ADB jel çözücü solüsyonu eklenmiştir. Karışım 55 °C’de 10 dakika inkübasyon süresince aralıklı olarak hafifçe ters düz edilerek çözünme sağlanmıştır. Elde edilen çözelti, kit ile birlikte verilen kolonlu tüplere aktarılmış ve oda sıcaklığında 11.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, kit protokolünde belirtilen yıkama ve santrifüj adımları sırasıyla uygulanmıştır. Son aşamada elüsyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında kısa bir inkübasyon yapılmış, ardından 11.000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek DNA kolondan elde edilmiştir.

5.2.7. Dna ürününün ve lentiviral vektörün restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Elde edilen GPR88 DNA ürünü ve bisistronik vektör, SalI (FD0644, Thermo Fisher) ile XbaI (ER0681, Thermo Fisher) restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Kesim reaksiyonları için 10X Fast Digestion Solüsyonu (B64, Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.7.1’de gösterilmiştir. Hazırlanan karışımlar 37 °C’de 45 dakika inkübe edildikten sonra, enzimlerin etkinliğini durdurmak amacıyla 55 °C’de 5 dakika inkübasyon uygulanarak reaksiyon sonlandırılmıştır.

Tablo 5.2.7.1: Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Reaksiyonu bileşenleri

| | PCR Ürünü | Lentiviral Vektör |
|------------------------|-----------|-------------------|
| Ürün (1µg/µl) | 26 | 5 |
| 10x Fast Digest Buffer | 3 | 2 |
| Sal I | 0,5 | 0,5 |
| Xba I | 0,5 | 0,5 |
| dH ₂ O | - | 12 |
| Toplam | 30 | 20 |

5.2.8. GPR88 DNA ürününün ve lentiviral vektörün saflaştırılması, konsantre edilmesi

Zymo DNA Clean and Concentrate-5 kiti (D4013, Zymo Research, ABD) kullanılarak kesim işlemi sonrasında elde edilen DNA ürünü ve vektör, restriksiyon enzimlerinden arındırılarak geri kazanılmıştır. Kit protokolüne uygun olarak, GPR88 DNA ürünü 1,5 ml santrifüj tüpüne alındıktan sonra 2 ila 7 katı miktarda DNA binding buffer eklenmiştir. Hazırlanan karışımlar kolona aktarılmış ve kolonlar toplayıcı tüplere yerleştirilerek 11.000 g’de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Bu adımı takiben, kolon iki kez 200 µl wash buffer ile yıkanmış ve her yıkamadan sonra aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Son aşamada, kolona 20 µl elution solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve ardından 11.000 g’de 30 saniye santrifüj

edilmiştir. Elde edilen GPR88 DNA ürünü ve lentiviral vektör konsantrasyonları NanoPhotometer (P300, Implen, Almanya) cihazıyla ölçülmüştür.

5.2.9. GPR88 DNA ürününün ve lentiviral vektörün birleştirilmesi

Sall ve XbaI restriksiyon enzimleri ile kesilen GPR88 DNA ürünü, pLenti vektörü ile T4 DNA ligaz enzimi içeren Rapid DNA Ligation kiti (K1422, NEB Biolab, İngiltere) kullanılarak birleştirilmiştir. Vektör miktarına bağlı olarak, 58 ng vektöre karşılık klonlanacak GPR88 DNA parçasının miktarı ve uygun birleşme oranları NEBio Calculator Ligation Calculator (Sürüm 1.9.0, NEB Biolabs, İngiltere) aracılığıyla belirlenmiştir. Bu hesaplama doğrultusunda 2:1, 3:1, 5:1 ve 7:1 olmak üzere farklı birleşme oranlarında reaksiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar 22 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Tablo 5.2.9.1’de birleşme reaksiyonunun bileşenleri ve hacimleri detaylı olarak sunulmaktadır.

Tablo 5.2.9.1: GPR88 Birleşme Reaksiyonu Bileşenleri

| Malzemeler | 2:1 | 3:1 | 5:1 | 7:1 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| p-Lenti Ef1α | 2 | 2 | 2 | 2 |
| GPR88 | 1,41 | 2,11 | 3,52 | 4,92 |
| T4 Ligase | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 5x Buffer | 2 | 2 | 2 | 2 |
| H ₂ O | 4,09 | 3,39 | 1,98 | 0,58 |
| Toplam | 10 | 10 | 10 | 10 |

5.2.10. Kompetent bakteri hazırlama

Eksi 80 °C’de muhafaza edilen Escherichia coli bakterileri çözündürüldükten sonra, antibiyotik içermeyen katı LB agar (A8523, Biomatik, ABD) besiyeri üzerine yayılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra, agar plate gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, agar yüzeyinden alınan tek bir koloni, 5 ml LB sıvı besiyerine (A8523, Biomatik, ABD) aktarılmış ve hücre süspansiyonu 37 °C’de, 220 rpm çalkalayıcılı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Elde edilen süspansiyondan 1 ml alınarak 100 ml LB sıvı besiyerine ilave edilmiş ve 37 °C’de

yaklaşık 3 saat, 220 rpm hızında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda 600 nm’de optik yoğunluk (OD) ölçülerek 0,3 değerine ulaşılmıştır.

Bakteri süspansiyonu, buz üzerinde soğutulmuş 50 ml’lik deney tüplerine bölünmüş ve 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. Ardından tüpler 3000 g’de 5 dakika boyunca +4 °C’de santrifüjlenmiştir. Üstteki sıvı atılmış ve oluşan bakteri pellet’i buzla soğutulmuş 1 ml (100 mM) CaCl₂ içinde çözülerek yeni bir deney tüpüne aktarılmıştır. Bu süspansiyon 1 saat boyunca buzda inkübe edilmiş, sonrasında tekrar 3000 g’de 5 dakika boyunca +4 °C’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, 500 µl buzla soğutulmuş 100 mM CaCl₂ içinde yeniden çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

5.2.11. Transformasyon

Kompetent bakteri süspansiyonundan 50 µl alınarak yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 µl vektör-GPR88 karışımı eklenmiştir. Bu karışım buzda 30 dakika inkübe edildikten sonra, 42 °C su banyosunda 60 saniyelik ısı şoku uygulanarak transformasyon gerçekleştirilmiştir. Isı şoku sonrası tüp 2 dakika buz üzerinde soğutulmuş, ardından 250 µl LB sıvı besi yeri eklenerek 37 °C’de çalkalayıcı inkübatörde 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, kanamisin antibiyotiği (14100; Pan Biotech, Almanya) içeren LB agar plakalarına bakteriyel süspansiyon eklenmiş ve plakalar gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

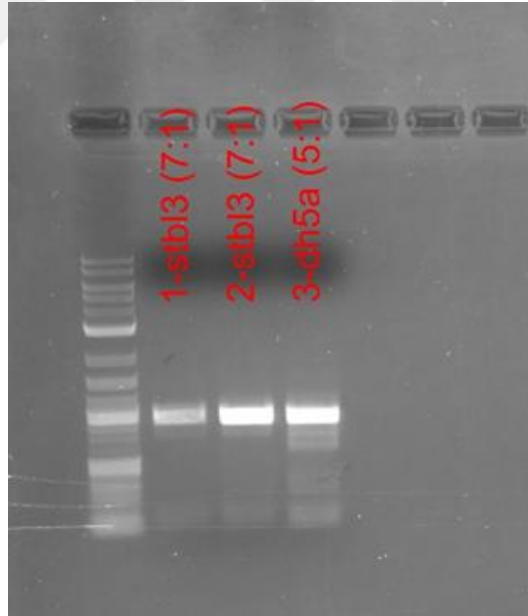
5.2.12. Transformasyon sonrası GPR88 için koloni pcr yapılması

Pozitif olduğu düşünülen birkaç koloni seçilerek 50 µl saf suya aktarılmıştır. Bu örneklerden elde edilen cDNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonları, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase PCR Kit (M0491, New England BioLabs, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer konsantrasyonu 0,5 mM olarak ayarlanmıştır. Tablo 5.2.12.1’de PCR reaksiyon bileşenlerine ilişkin ayrıntılar yer almaktadır. PCR işlemi T100™ (Bio-Rad, ABD) termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, döngü adımları yine Tablo 5.2.12.1’de’de belirtilmiştir. PCR sonrası elde edilen ürünler 6X yükleme boyası (R0631; Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek %0,8 agaroz jelde 120 V’da yürütülmüştür. DNA boyutu karşılaştırması için 1 kb (O’GeneRuller-ready to use,

Thermo Scientific, ABD) belirteç kullanılmıştır. Jel görüntülemesi Bio-Rad Chemidoc (1708280; Bio-Rad Life Sciences Research, ABD) sistemi ile yapılmış ve yaklaşık 1155 baz çifti uzunluğundaki GPR88 DNA bandının varlığı doğrulanmıştır.

Tablo 5.2.12.1: Koloni PCR protokolü

| Malzemeler | Hacim (µl) | PCR Basamakları | Zaman | Sıcaklık |
|------------------|------------|-------------------------|--------|----------|
| cDNA (ligasyon) | 2,5 | Başlangıç Denatürasyonu | 30 sn | 98°C |
| Q5 Polimeraz | 0,1 | Denatürasyon | 10 sn | 98°C |
| 5x Buffer | 2 | Bağlanma | 10 sn | 60-70°C |
| İleri Primer | 0,5 | Uzama | 60 sn | 72°C |
| Geri Primer | 0,5 | Son Uzama | 120 sn | 72°C |
| dNTP | 0,2 | Bitiş | ∞ | 4°C |
| H ₂ O | 4,2 | | | |
| TOPLAM | 10 | | | |



Şekil 5.2.3: Koloni PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

5.2.13. Plazmid izolasyonu

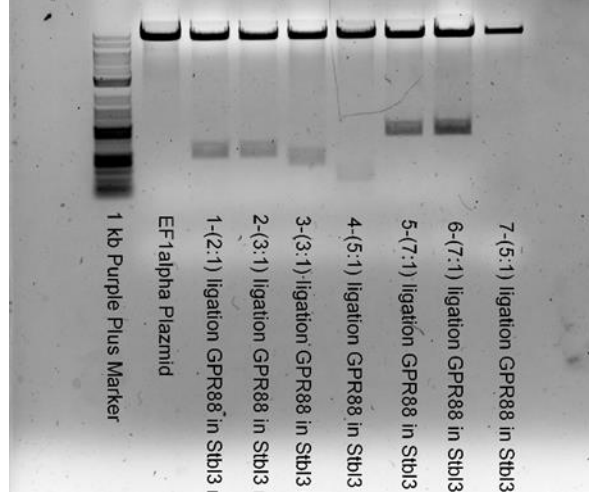
Plazmid izolasyonu için Zymo Plazmid Mini Prep kiti (D4015, Almanya) kullanılmıştır. Artan kopya sayılı bakteri süspansiyonu 3500 g'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş, süpernatant (LB besiyeri) atılmıştır. Oluşan bakteri pelleti, kitte bulunan 200 µl P1 solüsyonu ile yeniden süspanse edilmiştir. Ardından sırasıyla 250 µl P2 ve P3 solüsyonu eklenmiş, karışım oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir. Bu aşamayı buz üzerinde 5 dakikalık inkübasyon izlemiş, sonrasında örnek 16.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama adımlarının ardından karışım kolona aktarılmış ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmid başarıyla izole edilmiştir.

5.2.14. Restriksiyon enzimleri ile plazmidlerin konfirme edilmesi

pLenti vektörüne insan GPR88 transkriptinin klonlandığını doğrulamak amacıyla, izole edilen plazmidler SalI ve XbaI restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Bu kesim işlemleri için 10X Fast Digestion Solüsyonu (B64, Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.14.1'de ayrıntılı olarak sunulmaktadır.

Tablo 5.2.14.1: Restriksiyon Reaksiyonu Bileşenleri

| | Lentiviral Vektör |
|------------------------|-------------------|
| Ürün (1µg/µl) | 5 |
| 10x Fast Digest Buffer | 2 |
| Sal I | 0,5 |
| Xba I | 0,5 |
| dH ₂ O | 12 |
| Toplam | 20 |



Şekil 5.2.4: Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü

5.2.15. Plazmid sayısının yüksek miktarda çoğaltılması ve izolasyonu

Lentivirüs paketleme işleminden önce, onaylanmış plazmidin yüksek miktarda elde edilmesi gerekmektedir. Bunun için doğrulanmış plazmitler ve Dharmacon firmasından temin edilen sh-GPR88 plazmidleri, yeniden transformasyon yoluyla kompetan bakterilere aktarılmış ve bakteri kopya sayısı artırılmıştır. Ardından ZymoPURE Plasmid Midiprep (D4200, Almanya) kiti protokolüne uygun şekilde uygulanarak yüksek miktarda plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyonu NanoPhotometer (P300, Implen, Almanya) ile ölçülmüştür.

İnhibisyonu sağlayacak plazmidlerin etkin üretimi sağlanamadığından, Dharmacon üzerinden tedarik edilen plazmidler (sh-GPR88_1, sh-GPR88_2, sh-GPR88_3) protokole uygun biçimde çoğaltılmıştır.

5.2.16. Lentivirüslerin paketlenmesi ve üretimi

Moleküler klonlama yöntemleri ile GPR88 proteininin ifadesi artırılmış ve Dharmacon firmasından temin edilen shGPR88 plazmidleri, yüksek miktarda çoğaltıldıktan sonra lentivirüs üretimi için pax ve pmd.2 plazmitleriyle birlikte paketlenmiştir. Lentivirüs paketleme aşamasında Lipofectamine 3000 (L3000001, Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. %90-95 yoğunluğa ulaşmış 293T hücreleri 1,5 ml tripsin (25200-056, Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) ile besiyerinden ayrılmış

ve her bir 10 cm'lik hücre plağına $5,5 \times 10^6$ hücre gelecek şekilde, toplamda 12 ml Dulbecco's modified medium (DMEM; P04-01158, Pan Biotech, Almanya) kullanılarak ekim yapılmıştır. Hücreler, bir gece boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C'deki Heracell™ 150i hücre inkübatöründe (50116048, Thermo Fisher Scientific, ABD) inkübe edilmiştir.

Ertesi gün Lipofectamine 3000 ve Opti-MEM (31985062, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. A tüpünün bileşenleri Tablo 5.2.16.1'de, B tüpünün bileşenleri ise Tablo 5.2.16.2'de gösterilmiştir. A tüpü, B tüpünün içine eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun ardından 10 cm'lik plakalar inkübatörden çıkarılmış, DNA-lipid kompleksi eklenmeden önce plakadaki besiyerinin 6 ml'si geri çekilmiştir. DNA-lipid karışımı damla damla plakaya ilave edilerek plakalar yeniden %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatörde 6 saat inkübe edilmiştir. Altı saatin sonunda plakalardaki besiyerinin tamamı alınmış ve her birine yeni 12 ml DMEM eklenmiştir. Hücreler gece boyunca inkübatörde tutulmuştur. 24 saat sonra hücrelerin transfeksiyon besiyeri toplanarak 4 °C'de saklanmış, plakalara tekrar 12 ml DMEM eklenmiştir. Yaklaşık 52 saat sonra transfeksiyon besiyeri tekrar toplanmıştır.

Toplanan tüm transfeksiyon besiyerleri 2000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 0,45 µm low binding filtrelerden (SLHP033RS, Merck Millipore, ABD) geçirilerek hücre kalıntılarında arındırılmıştır. Filtrelenmiş besiyeri ultrasantrifüj tüplerine (344058, Beckman Coulter, ABD) aktarılmış ve 100.000 g'de 2 saat süren ultrasantrifüj işleminden sonra tüp diplerinde pellete dönüşen virüs partikülleri, kalsiyum ve magnezyum içermeyen Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; P04-3650, Pan Biotech, Almanya) içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo 5.2.16.1: A tüpü reaksiyon bileşenleri

| A Tüpü Reaksiyon Bileşenleri | Hacim (µl) |
|------------------------------|---------------|
| Lipofectamin 3000 (L3000) | 41,0 µl |
| Opti- MEM Besiyeri | 1.459,0 µl |
| Toplam | 1,5 µl |

Tablo 5.2.16.2: B tüpü reaksiyon bileşenleri

| B Tüpü Reaksiyon Bileşenleri | Hacim (µl) |
|--|---------------------|
| pMD2.G plazmid | 7,0 µl (0.5 µg/ µl) |
| psPAX plazmid | 7,0 µl (1.0 µg/ µl) |
| Lv-GFP veya Lv-GPR88 veya scrNA veya shGPR88 plazmidleri | 7,0 µl (1.0 µg/ µl) |
| P3000 bileşeni | 35,0 µl |
| Opti-MEM Besiyeri | 1,444,0 µl |
| Toplam | 1,5 µl |

5.2.17. Primer striatal hücre kültürünün yapılması

Cam tabanlı plakalar 1x Poly-D Lysine kullanılarak kaplandı. Yeni doğan dekapite edilerek beyni diseke edildi. Beynin striatum bölgesi L15 medium içerisinde DNase ve Papain ile muamele edilerek 45 dk enzimatik parçalamaya bırakıldı. Enzimatik parçalama sonrası tritürasyon ile dokunun iyice parçalanması sağlandı. Hücre sayımı yapılarak plaka başına 25bin hücre ekimi yapıldı.

5.2.18. Lentivirüs titrasyonunun belirlenmesi

Akış Sitometrisi yöntemiyle, üretilen yüksek miktardaki virüslerin titrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla, cam tabanlı plakalara ekilmiş primer nöron hücreleri üzerine, dPBS kullanılarak seri dilüsyonla hazırlanmış (1:10, 1:100, 1:1000) virüs çözeltileri eklenmiş ve titrasyon çalışması yapılmıştır. Bu işlem için hücreler önce 800 µL dPBS ile kısa bir yıkama işlemine tabi tutulmuş, ardından 200 µL %0,25'lik tripsin/EDTA (25200056, Gibco Thermo Scientific, ABD) eklenerek enzimatik yolla

plakadan ayrılmıştır. Hücrelerin enzimatik ayrılmasını takiben, 800 µL hücre kültürü ortamı eklenerek reaksiyon durdurulmuş, hücreler 500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir. Elde edilen hücre peleti, %1 PFA içeren dPBS ile fikse edildikten sonra tekrar santrifüj edilerek dPBS içerisinde süspansiyon edilmiştir. Sonrasında, BD Influx Cell sorter Bioprotect IV güvenli kabinli (BD Bioscience) akış sitometrisi cihazı kullanılarak GFP ve RFP pozitif hücre oranları analiz edilmiş ve virüsün titrasyonu hesaplanmıştır.

5.2.18.1. Protein izolasyonu, konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması

Hücrelere lizis solüsyonu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 M EDTA, proteaz inhibitör kokteyli; 20-201, Millipore, ABD) eklenerek örnekler homojenize edilmiştir. Ardından, örnekler buz üzerinde 20 dakika inkübe edildikten sonra 14.000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant (üst faz) pelletlerden ayrılarak ayrı alikotlar halinde saklanmıştır.

Protein konsantrasyonları Qubit® Protein Çalışma Kiti (Q33211; Invitrogen, ABD) yardımıyla Qubit Fluorometer (Q32866; Invitrogen, ABD) cihazında ölçülmüştür. Ölçümlere göre örnek konsantrasyonları eşitlenmiş, 20 µg/10 µl miktarda protein olacak şekilde hesaplanarak 2X Laemmli buffer (161-0737; Bio-Rad, ABD) ile karıştırılmıştır. Karışım 70 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra hemen +4 °C'deki kırık buz üzerinde soğutularak işlem tamamlanmıştır.

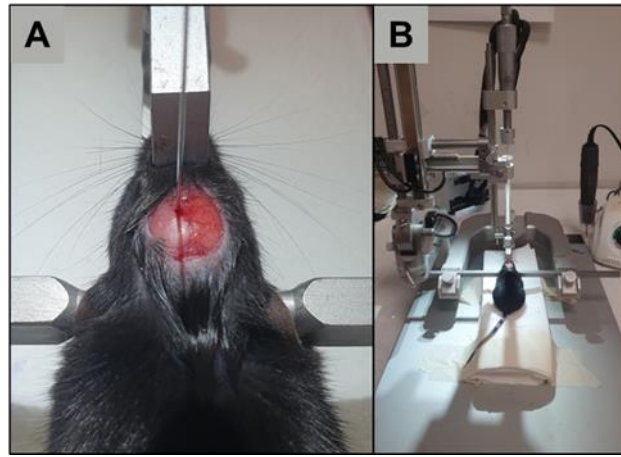
5.2.18.2. Western Blot

Örnekler, Any kD™ Mini-PROTEAN jel (456-9036, Bio-Rad, ABD) kuyucuklarına 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklendikten sonra önce 50 V'de 5 dakika, ardından 100 V'de 1 saat, son olarak 150 V'de 1 saat süreyle elektroforez uygulanmıştır. Daha sonra Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti (170-4272; Bio-Rad, ABD) kullanılarak jel üzerindeki proteinler PVDF membranlara aktarılmıştır. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1

saat bloke edilmiştir. Bloklamının ardından membranlar +4 °C’de gece boyunca bloklama çözeltisi içinde seyreltilen primer antikor (GPR88, PA3-044, Thermo Fisher) ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kez 5’er dakika yıkanmış, ardından bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bantların görselleştirilmesi için Clarity™ Western ECL Substrate (1705060, Bio-Rad, ABD) uygulanmış ve sonuçlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir.

5.3. Lentivirüslerin Beyin İçi Enjeksiyon Yöntemi ile Farelere Verilmesi

C57/Bl6 türü erkek farelere, intraperitoneal olarak 400 mg/kg kloral hidrat (23100; Sigma-Aldrich, ABD) uygulanarak anestezi sağlanmıştır. Anestezi altındaki fareler, sterotaksik tabla (502300, WPI, ABD) üzerine sabitlenmiştir. Serebral iskemi modeli oluşturulacak olan sol hemisferin striatum bölgesine, belirlenen koordinatlar (bregma: 0, lateral: -2.5 mm, derinlik: 2.5 mm) doğrultusunda hamilton enjektörü (Hamilton, Microliter, #701) ve mikro pompa (Micro4, WPI, ABD) kullanılarak, proje kapsamında üretilen lentivirüsler (2.3×10^7 virüs partikülü, 3 μ l 0.1 M PBS içinde) 750 nl/dk hızında enjekte edilmiştir.

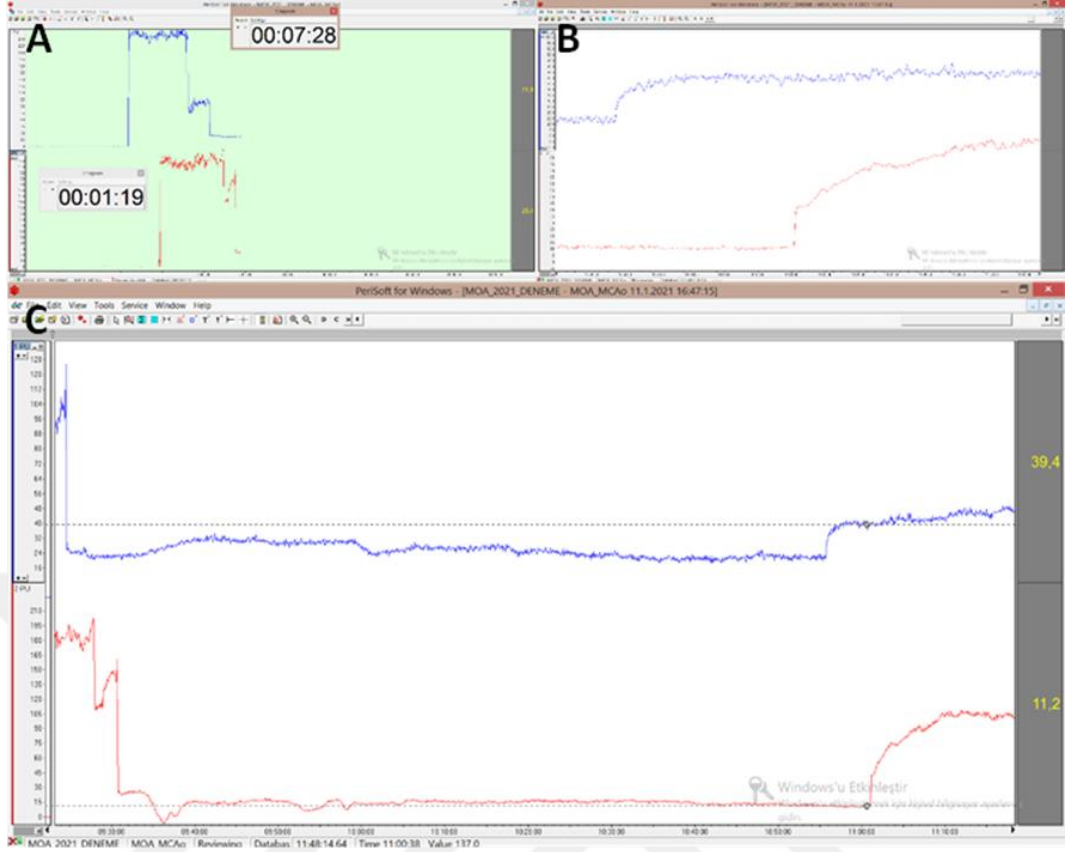


Şekil 5.3.1: Virüslerin beyin içi enjeksiyon yöntemi ile striatuma verilmesi. A. Striatum koordinatlarından kafatası delinmiş fareye beyin için enjeksiyonun uygulanışı. B. Sterotaksik tablaya yerleştirilmiş fare.

5.4. Orta Serebral Arter Tıkama Metodu (MCAO)

Yetişkin 8-12 haftalık C57BL/6j fareler, %30 O₂ ve geri kalan N₂O içeren gaz karışımı ile %2 izofluran kullanılarak anestezi altına alınmıştır. Deney boyunca, hayvanların vücut sıcaklıkları düzenli olarak ölçülmüş ve geri bildirim mekanizmasına sahip bir ısıtıcı (507221F, Harvard Apparatus, ABD) ile 36,5-37,0 °C arasında sabit tutulmuştur. Orta serebral arter tıkanması sırasında, serebral kan akımı ve sonrasındaki reperfüzyon, kafatasında orta serebral arter bölgesine (Bregma: posterior 2 mm, lateral 6 mm) yapıştırılan esnek 0.5 mm fiber-optik kablo (PROBE 418-1, Perimed, İsveç) ile laser doppler flowmetri (LDF) (PeriFlux Sistem 5000, Perimed, İsveç) kullanılarak izlenmiştir.

Fokal iskemi intraluminal filament yöntemi ile indüklenmiştir. Bu işlemde, boyun bölgesine orta hattın keski yapılarak cilt açılmış ve tükürük bezleri iki yana ayrılmıştır. Kommon karotid arter ve eksternal karotid arter izole edilip bağlanmıştır. İnternal karotid arter, mikrovasküler klips (FD562R, Aesculap, Almanya) ile geçici olarak kapatıldıktan sonra, kommon karotid arter üzerine keski yapılmış ve 185-190 µm kalınlığında silikon kaplı naylon monofilament 7-0 (P0812, Doğsan, Türkiye) damar içine yerleştirilmiştir. Filament, internal karotid arterdeki klipse kadar ilerletilmiş ve klips kaldırıldıktan sonra yaklaşık 9 mm mesafe boyunca, bifurkasyondan itibaren direnç hissedilene kadar itilmiştir. Beyin kan akımındaki anlık düşüş, iskemi oluşturulduğunu doğrulamak için kaydedilmiştir.



Şekil 5.4.1: Lazer Doppler Akış (LDF) kaydı. A. OSA girşinin tıkanmasını gösteren grafik. B. İskemi sonrası reperfüzyon grafiği. C. OSA tıkanması modelinde tüm zaman segmentlerini gösteren grafik.

İskemik süreç, 60 dakika (48 saat reperfüzyon) veya 30 dakika (72 saat reperfüzyon) olarak uygulanmıştır. Süre tamamlandıktan sonra filament çıkarılarak iskemi sonlandırılmıştır. Reperfüzyonun gözlemlenebilmesi için, 60 dakika iskemi sonrası 20 dakika ve 30 dakika iskemi sonrası 15 dakika daha LDF kaydı alınmıştır. Tüm işlemler tamamlandıktan sonra, hayvanların boynu 5-0 ipek ip (S2185, Doğsan, Türkiye) ile dikilmiş ve hayvanlar kendi kafeslerine yerleştirilmiştir.

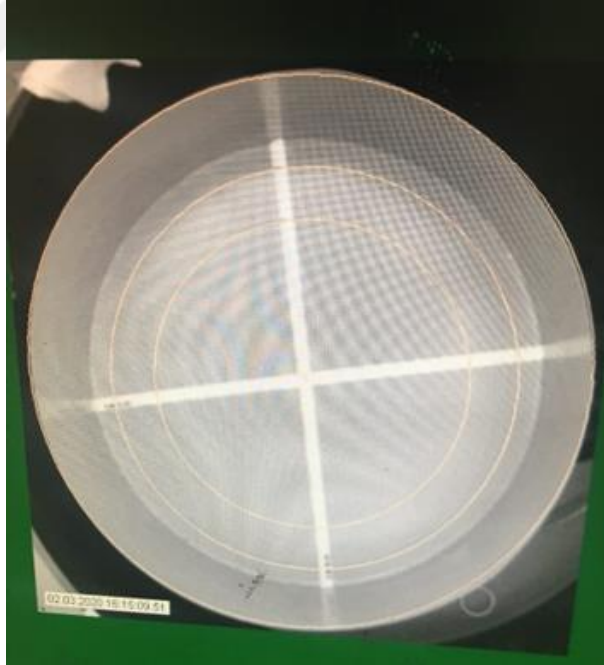
5.5. Davranış Deneyleri

MCAO ile oluşturulan serebral iskemi modeli, nörolojik fonksiyonlardaki değişikliklerin değerlendirilmesi için çeşitli davranış testleriyle analiz edilmektedir. Bu çalışmada, açık alan testi kullanılarak lokomotor aktivite ve buna bağlı parametreler incelenmiştir. Açık alan testi hem nöromotor hem de duygusal durumun

değerlendirilmesine olanak tanıyan bir yöntem olarak, serebral iskemi sonrası farelerde motor becerilerin yanı sıra keşif davranışı, aktivite düzeyi ve anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek için uygulanmıştır. Test sırasında farelerin hareket mesafesi, hız, durağan kalma süresi ve bölge tercihi gibi parametreler kaydedilmiştir.

5.5.1. Açık Alan Testi

Açık alan 100 cm çapında yuvarlak bir arenadır. Gri boyalı bir zemin ile kaplıdır. Platformu 35 cm yüksekliğinde gri polipropilenden yapılmış bir yan duvar çevrelemektedir. Spontan lokomotor aktiviteyi ve keşif davranışını ölçmeye izin vermektedir. Arena, bir dış duvar bölgesi, bir ara geçiş bölgesi ve bir iç bölge olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Her fare, merkez noktaya yakın bir noktada serbest bırakıldı ve 10 dakika boyunca gözlemlendi. Hayvanların kat ettiği yollar bir elektronik görüntüleme sistemi (Anymaze Version 4.99, Stoelting, ABD) ile izlendi ve kaydedildi.



Şekil 5.5.1: Açık alan testi için kullanılan deney düzeneği.

5.6. Nörolojik Skorlama

MCAO modeli ile oluşturulan serebral iskemi sonrası nörolojik fonksiyon kaybının değerlendirilmesinde objektif ve kantitatif yöntemler olarak nörolojik skorlama testleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Bederson skoru, modifiye edilmiş Garcia testi ve modifiye edilmiş Modo testi uygulanmıştır.

5.6.1. Bederson nörolojik skoru

Nörolojik durum değerlendirmesi, 60 dakika MCAO uygulanmasını takiben 48 saatlik reperfüzyon süresi sonunda, aşağıdaki puanlama sistemi kullanılarak yapılmıştır:

0: Normal motor fonksiyonlar.

1: Hayvan kuyruğundan kaldırıldığında gövde ve karşı taraftaki ön ayağın fleksiyonu.

2: Hareket sırasında karşı tarafa doğru dönme, ancak dinlenme sırasında normal postür korunması.

3: Dinlenme sırasında karşı tarafa doğru yaslanma.

4: Spontan motor aktivite kaybı.

5: Herhangi bir hareketin olmaması.

5.6.2. Modifiye edilmiş Garcia nörolojik skorlaması

Nörolojik skorlama 60 dakika MCAO ve 48 saat reperfüzyon sonrası hayvanların nörolojik durumları spontan etkinlik, dört uzuv hareketinde simetri, ön pati uzatma ve vücut proprioepsiyonuna göre değerlendirildi.

5.6.2.1. Spontan etkinlik

Hayvan normal ortamında (kafes) 5 dakika boyunca gözlemlendi. Farenin aktivitesi, kafesin dört duvarına da yaklaşma yeteneği ile değerlendirildi. Puanlar şunları gösterir: 3, fare hareket etti, çevreyi keşfetti ve kafesin en az üç duvarına yaklaştı; 2'de, hafifçe etkilenmiş fare kafeste hareket etti ama her tarafa yaklaşmadı ve hareket etmekte tereddüt etti, ancak sonunda kafesin en az bir üst kenarına ulaştı; 1,

ciddi şekilde etkilenmiş fare hiç kalkmadı ve kafeste zar zor hareket etti ve 0, fare hiç hareket etmedi.

5.6.2.2. Dört uzvun hareketinde simetri

Fare, dört uzvun hareketindeki simetriyi gözlemlemek için kuyruğundan havada tutuldu. Puanlar şunları gösterir: 3, dört uzuv da simetrik olarak uzatılmış; 2, sol taraftaki uzuvlar sağdakilerden daha az veya daha yavaş uzadı; 1, sol taraftaki uzuvlar minimal hareket gösterdi ve 0, sol taraftaki ön ayak hiç hareket etmedi.

5.6.2.3. Ön pati uzatma

Fare masanın kenarına getirildi ve kuyruğundan tutularak ön ayakları üzerinde yürümesi sağlandı. Sıçan masaya ulaşırken ve arka ayaklar havada tutulurken her iki ön ayağın uzanmasında simetri gözlemlendi. Puanlar şunları gösterir: 3, her iki ön ayak da uzanmıştı ve fare ön patiler üzerinde simetrik olarak yürüdü; 2, sol taraf sağa göre daha az uzanmış ve ön pati yürüyüşü bozulmuş; 1, sol ön ayak minimal olarak hareket etti ve 0, sol ön ayak hareket etmedi.

5.6.2.4. Vücut proprioepsiyon

Farenin vücudunun her iki yanına künt bir çubukla dokunuldu ve uyarana verilen tepki gözlemlendi. Puanlar aşağıdakileri gösterir: 3, fare başını çevirerek tepki verdi ve her iki taraftaki uyarana karşısında eşit derecede irkildi; 2, fare sol taraftaki uyarana yavaş tepki verdi ve 1, fare sol tarafa yerleştirilen uyarana tepki vermedi.

5.6.3. Modifiye edilmiş Modo nörolojik testi

Nörolojik skora 60 dakika MCAO ve 48 saat reperfüzyon sonrası hayvanların nörolojik durumları spontan motilite, doğrulma refleksi ve kavrama refleksine göre değerlendirildi.

5.6.3.1. Spontan motilite

Hayvan tanıdık bir ortamda boş bir yüzeye konur ve hareket etmesi ve çevreyi keşfetmesi beklenir. Hayvan 10 s sonra bu davranışı başlatmazsa, spontan motilitede bozulma olduğu kabul edilir.

5.6.3.2. Doğrulma refleksi

Hayvan, elinde sırtüstü pozisyonda tutulur. Hayvan kendiliğinden döner ve doğal pozisyonuna dönerse, doğrultma refleksi sağlamdır. Ancak hayvan dönmezse, doğrultma refleksini kaybeder.

5.6.3.3. Kavrama refleksi

Her bir uzvun altına bir çubuk yerleştirilir ve hayvanın çubuğu her iki ön patisiyle aynı anda tutması beklenir.

5.7. Cryostat Cihazı ile Beyin Kesimi

30 veya 60 dakika OSA tıkanmasının ardından sırasıyla 72 saat veya 48 saat reperfüzyon uygulanan fareler, yüksek doz izofluran anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Beyinler hızla çıkarılarak kuru buz üzerinde dondurulmuş ve Cryostat (CM1950, Leica, Almanya) kullanılarak kesitler hazırlanmıştır.

30 dakika MCAO uygulanan farelerin beyinlerinden, immünfloresan boyama için striatum seviyesinden (Bregma 0) 20 µm kalınlığında kesitler alınmış ve pozitif yüklü lamalar üzerine yerleştirilmiştir. 60 dakika MCAO sonrası 48 saat reperfüzyon yapılan farelerin beyinlerinden ise histokimyasal boyama amacıyla, bregmadan 2 mm kaudal ve 2 mm rostral olacak şekilde 2 mm aralıklarla kesitler hazırlanmıştır.

5.8. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

5.8.1. Cresyl violet boyaması, hasar hacmi ve beyin ödemi hesaplanması

Hasar hacmi ve beyin ödemi değerlendirme amacıyla cresyl violet boyaması uygulanmıştır. 60 dakika MCAO ardından 48 saat reperfüzyon ve 30 dakika MCAO ardından 72 saat reperfüzyon protokolü uygulanan fareler, izofluran anestezisi altında bayıltılarak dekapite edilmiştir. Beyinler çıkarılıp kuru buz üzerinde dondurulduktan sonra, cryostat kullanılarak 20 µm kalınlığında koronal kesitler hazırlanmıştır.

60 dakika MCAO uygulanan farelerin beyinlerinden, birbirine eşit 2 mm mesafede bulunan dört farklı bölgeden (bregma +2.0, 0.0, -2.0 ve -4.0) kesitler alınmıştır. Hazırlanan kesitler, 40°C sıcaklığa ayarlanmış ısıtıcı tabla (HP-LP1,

WiseTherm, Almanya) üzerinde pozitif yüklü lamalar (Isoterm, Almanya) üzerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 30 dakika daha tabla üzerinde bekletilerek lam üzerine sabitlenmiştir.

Cresyl violet boyaması, standart histolojik boyama protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kesitler önce %4 paraformaldehit (PFA, 158127, Sigma Aldrich, ABD) ile fikse edilmiş ve ardından 0.1 M fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben kesitler cresyl violet ile boyanmış, yükselen alkol serilerinden geçirilmiş ve son olarak ksilen (534056, Sigma Aldrich, ABD) ile işlenip entellan (1.079.610.500, Merck Millipore, ABD) ile kapatılmıştır.

60 dakika MCAO ve 48 saat reperfüzyon sonrası cresyl violet ile boyanan kesitler taranmış ve Image J yazılımı (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak hasar hacmi ve ödem analizleri yapılmıştır.

5.8.2. DNA fragmentasyon analizi

DNA kırıklarının tespiti ve ölçümü için Terminal Transferase Biotinylated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL, 11684795910, Roche, ABD) kiti kullanılmıştır. 30 dakika MCAO ve 72 saat reperfüzyon uygulanan hayvanların beyin kesitleri, önce %4 PFA ile fikse edilmiş, ardından 0.1 M PBS ile yıkanmıştır. Antijen geri kazanımı sitrat kullanılarak sağlanmış ve bloklama işlemi normal keçi serumu (NGS, G9023, Sigma Aldrich, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kesitler TUNEL karışımı ile reaksiyona sokulmuş ve hücre çekirdeklerinin görselleştirilmesi için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) ile boyanmıştır.

Boyanmış kesitlerdeki TUNEL pozitif hücreler, striatum bölgesinde rastgele seçilen 62.500 μm^2 lik 9 farklı alanda sayılmıştır.

5.8.3. Nöronal sağkalım analizi

30 dakika MCAO 72 saat reperfüzyon yapılan hayvanlardan alınan beyin kesitleri 15 dakika %4 PFA ile fikse edilip, 0.1 M PBS ile yıkanmıştır, bloklama NGS ile yapıldıktan sonra oda sıcaklığın 1 saat NeuN primer antikoruyla (MAB377c3, Millipore, ABD) inkübe edilmiştir. Kesitler daha sonra 0.1 M PBS ile yıkandı ve son olarak hücre çekirdeklerini görüntüleyebilmek için DAPI ile boyanmıştır. Boyanan

kesitlerdeki NeuN pozitif hücreler, striatum bölgesinden rastgele seçilen 62.500 µm² alanındaki 9 bölgede sayılmıştır.

5.8.4. İmmunoglobulin G Boyaması

İmmünoglobulin (IgG) boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent, R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories, ABD) kiti kullanılmıştır. 60 dakika OSA tıkanması sonrası 48 saatlik reperfüzyon uygulanan farelerden alınan striatum düzeyindeki koronal kesitler, önce %4 PFA ile 15 dakika süreyle fikse edilmiştir. Ardından, PFA'nın uzaklaştırılması için kesitler 0.1 M PBS ile çalkalayıcı üzerinde 3 kez, her biri 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Örnekler, %0.3 H₂O₂ içeren metanol içerisinde 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 0.1 M PBS ile çalkalayıcıda 3 kez, 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Bloklama işlemi, oda sıcaklığında normal at serumu (NHS, Vectostain) ile 10 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Bloklamadan sonra, örnekler 0.1 M PBS ile 5 dakika yıkanmış ve biyotinlenmiş ikincil antikor eklenerek çalkalayıcı üzerinde 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler tekrar 0.1 M PBS ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Örnekler, streptavidin/peroksidaz kompleksi ile 5 dakika boyunca işlem görmüş ve ardından yine 0.1 M PBS ile 5 dakika yıkanmıştır. DAB substrat solüsyonu, kit talimatlarına uygun şekilde hazırlanmıştır: 2.5 ml dH₂O içerisine 1 damla stok tampon solüsyonu, 2 damla DAB stok solüsyonu ve 1 damla H₂O₂ eklenip karıştırılmıştır. Hazırlanan DAB substrat solüsyonu, örneklerin üzerine uygulanarak reaksiyon başlatılmış ve yaklaşık 90 saniye sonra soğuk 0.1 M PBS ile reaksiyon durdurulmuştur. İşlem tamamlandıktan sonra, örnekler sulu ortam birleştirici (F4680, Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak lamellerle kapatılmıştır.

5.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS (sürüm 22; SPSS Inc., Chicago, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler analiz edilirken GPR88'in aşırı ifadesi tanımlayan grup (Lv-GFP ve Lv-GPR88) kendi arasında, inhibisyonunu tanımlayan grup (scRNA ve sh-GPR88) kendi arasında değerlendirilmiştir. Basıklık ve çarpıklık değerlerinin -1.5 ile +1.5 arasında olması, verilerin normal dağılım gösterdiği şeklinde kabul edilmiştir (48). Kategorik değerler için Mann-Whitney U testi kullanılırken

sayısal değerler için Bağımsız Örneklem T-Testi kullanılmıştır. Farklı parametrelerin karşılıklı ilişkilerini ölçmek adına korelasyon analizi yapılmıştır.

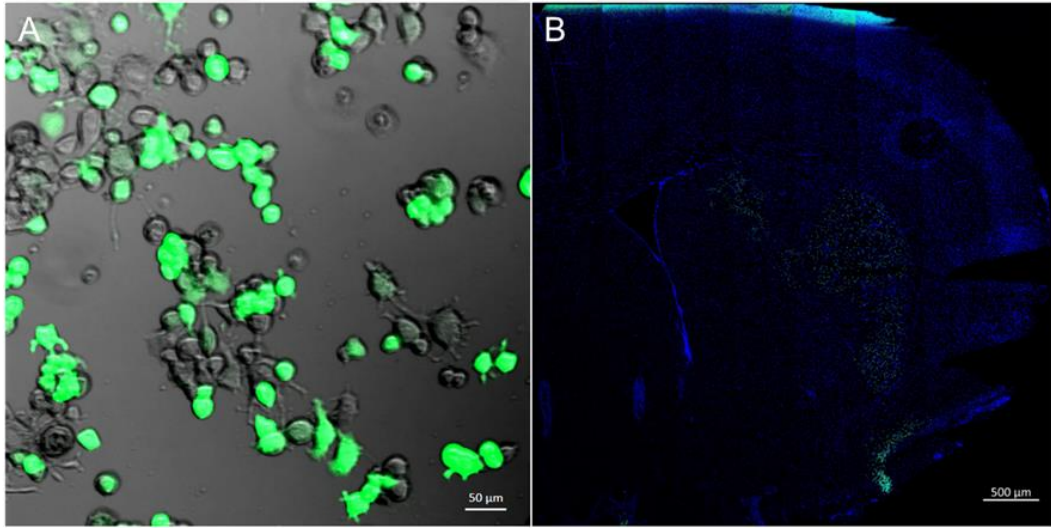


6. BULGULAR

6.1. Moleküler Çalışmalar

6.1.1. Aşırı ekspresyon bulguları

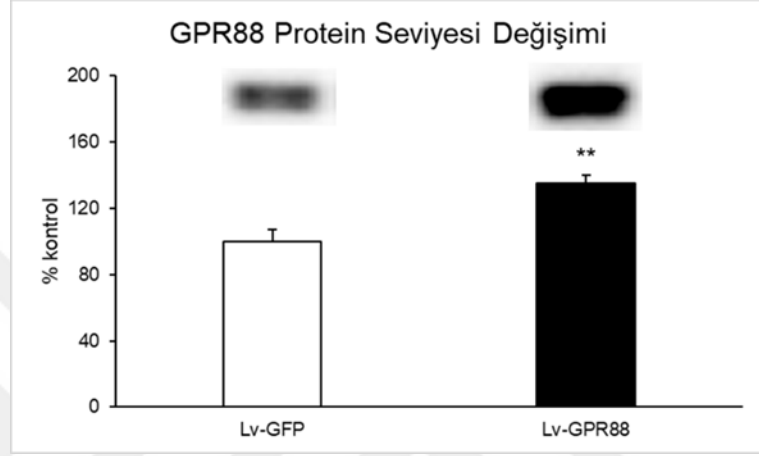
Lentiviral vektörlerin kullanımıyla gerçekleştirilen GPR88 aşırı ekspresyonu, hem HeLa hücre hattını enfekte etmesiyle hem de fare beynine yapılan enjeksiyonların ardından başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Lentiviral vektörlerin etkinliği, GFP pozitif hücrelerin dağılımını inceleyen floresan mikroskopi analizleriyle kanıtlanmıştır; bu analizler, vektörlerin hedef dokuda spesifik olarak lokalize olduğunu göstermiştir. Moleküler düzeyde, PCR ile GPR88 geninin kodlama bölgesinin başarılı bir şekilde amplifiye edildiği ve bu genin lentiviral vektörler aracılığıyla taşındığının doğrulandığı belirlenmiştir.



Şekil 6.1.1: GPR88 aşırı ifade (overexpression) grubunda GPR88 protein lokalizasyonu ve hücresel görünümü. (A) Hücre kültürü ortamında GPR88'in aşırı ekspresyonunu gösteren floresan mikroskop görüntüsü. Yeşil floresan protein (GFP) pozitif hücreler, lentiviral vektör aracılığıyla GPR88'in başarılı bir şekilde aşırı ifade edildiğini göstermektedir. (B) Fare striatumunda GPR88'in lokalizasyonunu gösteren in vivo floresan mikroskop görüntüsü. GFP pozitif bölgeler, GPR88'in lentiviral

vektör aracılığıyla striatuma hedefli olarak taşındığını ve lokalize olduğunu göstermektedir.

Western blot yöntemi ile GPR88 proteininin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir ($p=0.002$) (Şekil 6.1.2). Özellikle striatum bölgesinde gözlenen bu artış, lentiviral vektörlerin hem hücresel hem de dokusal düzeyde yüksek bir etkinlik sergilediğini ortaya koymuştur.

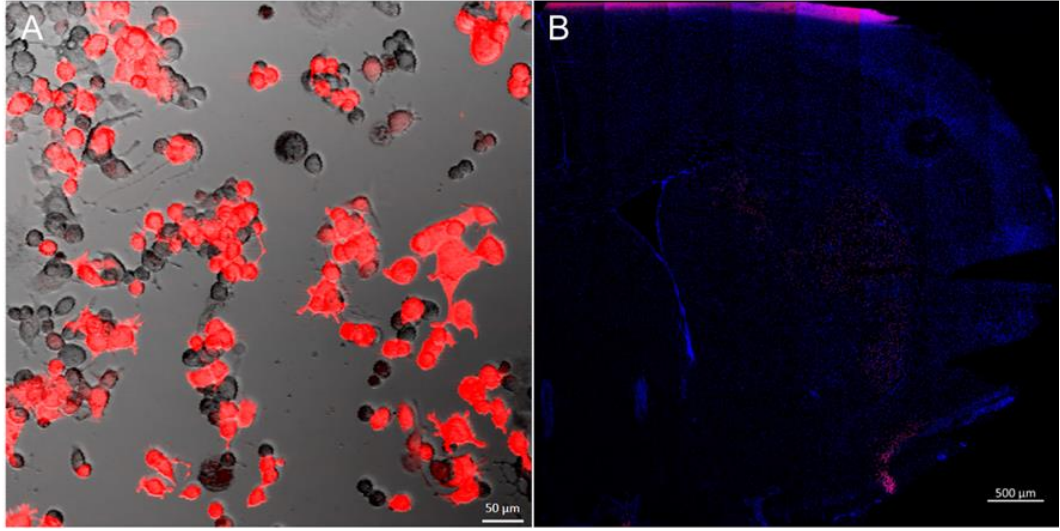


Şekil 6.1.2: GPR88 aşırı ekspresyonunun GPR88 protein seviyeleri üzerindeki etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

6.1.2. Baskılama bulguları

GPR88 protein düzeyini azaltmak için temin edilen ticari kit içinde üç farklı plazmid bulunmaktadır. Bu plazmidlerden hangisinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde GPR88 protein düzeyini azalttığı incelenmiştir.

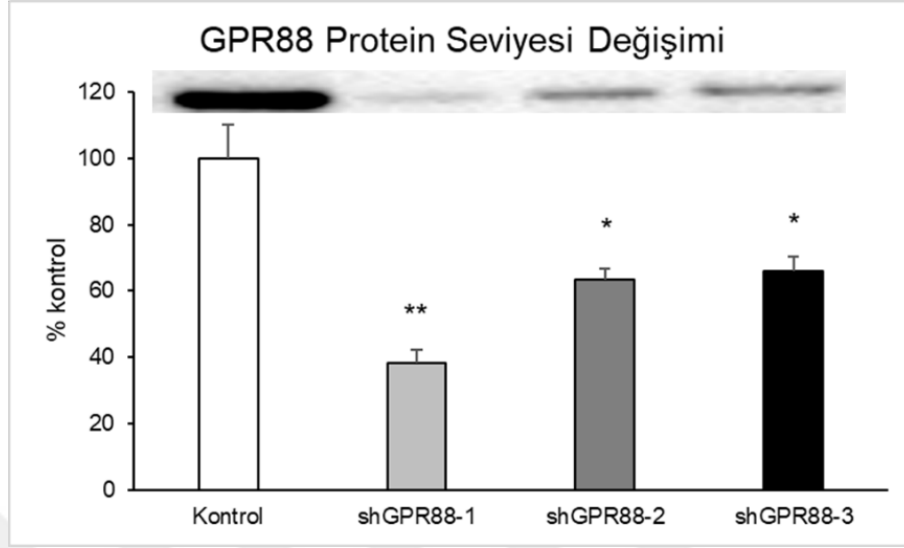
GPR88 geninin inhibisyonu için kullanılan shRNA lentiviral vektörleri, hedef dokularda etkili bir gen susturma sağladığını göstermiştir. RFP pozitif hücreler üzerinden yapılan floresan mikroskopi analizleri, lentiviral vektörlerin başarılı bir şekilde dokulara ulaştığını ve gen inhibisyonunun hedef bölgelerde spesifik olarak gerçekleştiğini doğrulamıştır.



Şekil 6.1.3: GPR88 inhibisyon grubunda GPR88 protein ekspresyonu ve lokalizasyonu. (A) Hücre kültürü ortamında GPR88'in inhibisyonunu gösteren floresan mikroskop görüntüsü. Kırmızı floresan protein (RFP) pozitif hücreler, lentiviral vektör aracılığıyla GPR88'in etkili bir şekilde baskılandığını göstermektedir. (B) Fare striatumunda GPR88 ekspresyonunun baskılanmasını gösteren in vivo floresan mikroskop görüntüsü. RFP pozitif bölgeler, lentiviral vektör aracılığıyla GPR88'in striatumda başarılı şekilde inhibe edildiğini ortaya koymaktadır.

GPR88 protein düzeyini azaltmak için temin edilen ticari kit içinde üç farklı plazmid bulunmaktadır. Bu plazmidlerden hangisinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde GPR88 protein düzeyini azalttığı incelenmiştir. En yüksek verimliliğe sahip plazmid seçmek için HeLa hücre hattına transfeksiyon yapıldıktan sonra hücreler toplandı ve Western blot yöntemi ile bu hücrelerde GPR88 protein seviyeleri incelendi. Üçlü gliserol stokundaki GPR88 proteinine özgü shRNA plazmidleri shGPR88-1, shGPR88-1-2 ve shGPR88-1-3 olarak adlandırılmıştır. Bu plazmidlerden üretilen virüsler HeLa hücre hattına uygulandıktan sonra enfekte olan hücrelerde GPR88 protein düzeyi Western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmelerde üç plazmidin de istatistiksel olarak önemli bir düzeyde ($p < 0.05$) GPR88 protein seviyesini azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak en büyük azalma shGPR88-1 plazmid grubunda gözlemlenmiştir ($p = 0.000$). Bu bilgiler doğrultusunda

projenin diğ er tüm bölümlerinde shGPR88-1 plazmidinin GPR88 protein inhibisyonu amacıyla kullanılacağı belirlenmiştir.

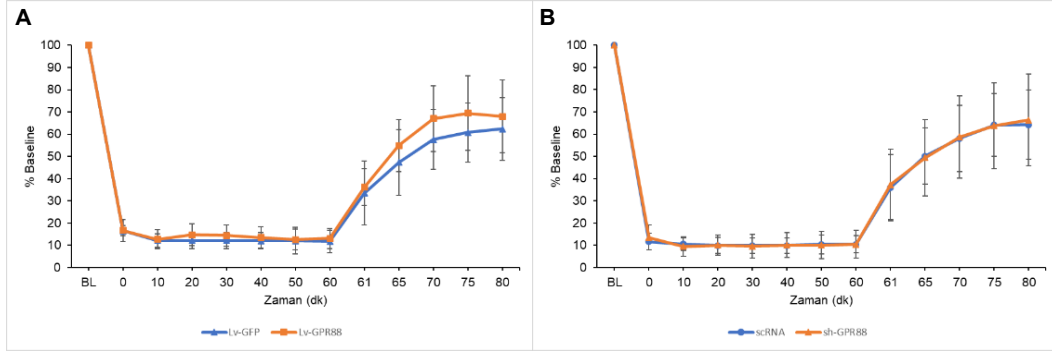


Şekil 6.1.4: GPR88 inhibisyonuna yönelik shRNA'ların GPR88 protein seviyeleri üzerindeki etkisi (*p<0.05, ** p<0.01).

6.2. GPR88'in Serebral Kan Akımı Üzerindeki Etkileri

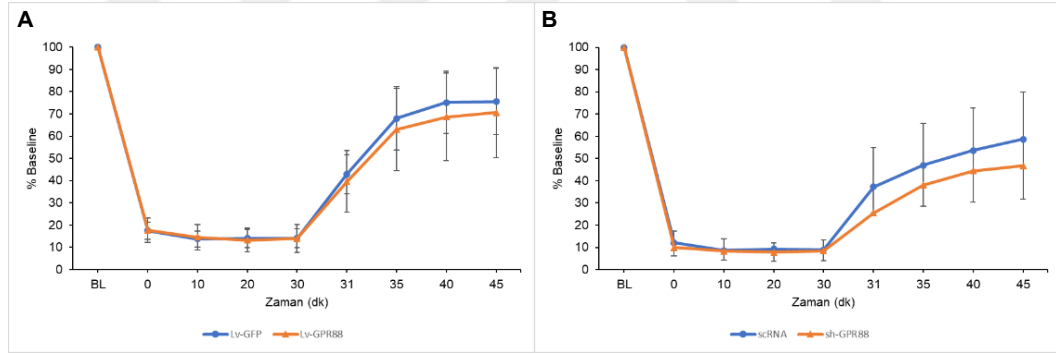
GPR88 proteinin ekspresyonunda yapılan değişikliklerin akut etkilerini incelemek amacı ile 30 dakika ve 60 dakika MCAO modeli farelere uygulanmıştır. MCAO ve reperfüzyon sırasında serebral kan akışı Lazer Doppler Akış Ölçümü (LDF) ile izlenmiştir. Bunun için, 0,5 mm'lik esnek bir fiber optik prob (Perimed, İsveç) MCA bölgesinin üzerindeki sağlam kafatasına (AP: +2 mm ve ML: bregmadan +6 mm) doku yapıştırıcısı ile tutturulmuştur.

Kan akışının hem 60 (Şekil 6.2.1) hem de 30 dakikalık (Şekil 6.2.2) iskemi için MCAO başlatılmasından hemen sonra ortalama yüzde 80'den fazla düşüş yaşandığı kayda alınmıştır. Bu düşüş, her bir deney grubu için 60 veya 30 dakikanın sonunda filament çıkarılana kadar gözlemlenmiştir. Filamentin çekilip, reperfüzyonun başlatılmasıyla dakikalar içinde beyne kan akışının yeniden sağlandığı gösterilmiştir.



Şekil 6.2.1: 60 dakika MCAO modelinde Lazer Doppler akış grafikleri ile serebral kan akımı değerlendirilmesi. (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Farelerin beyin kan akımları analiz edildiğinde, 60 dakika MCAO modeli uygulanan hem GPR88 protein ifadesi artırılmış (Şekil 6.2.1.A) hem de baskılanmış (Şekil 6.2.1.B) gruplarda LDF değerlerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 6.2.2: 30 dakika MCAO modelinde Lazer Doppler akış grafikleri ile serebral kan akımı değerlendirilmesi. (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Farelerin beyin kan akımları analiz edildiğinde, 30 dakika MCAO modeli uygulanan hem GPR88 protein ifadesi artırılmış (Şekil 6.2.2.A) hem de baskılanmış (Şekil 6.2.2.B) gruplarda LDF değerlerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

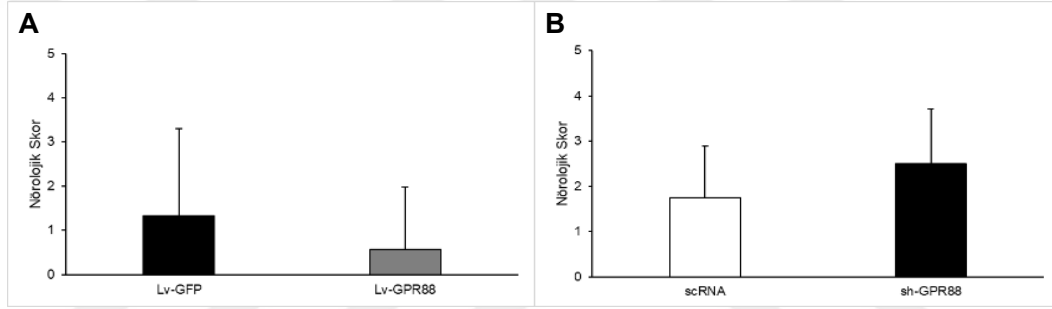
6.3. GPR88'in Serebral İskemi Modelinde Nörolojik Etkileri

6.3.1. 60 dakika MCAO modelinde GPR88'in nörolojik etkileri

GPR88'in akut dönemde etkisinin araştırılması için indüklenen 60 dakika MCAO modelinde hayvanların nörolojik durumları Bederson testi, modifiye edilmiş Garcia testi ve modifiye edilmiş Mudo testi uygulanarak belirlenmiştir.

6.3.1.1. Bederson nörolojik skorlaması

Farelerde Bederson skorlaması 5 seviye üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sakrifikasyon öncesinde alınan skorlar hayvanların nörolojik durumlarını gösteren önemli bir parametre olarak kabul edilmiştir.



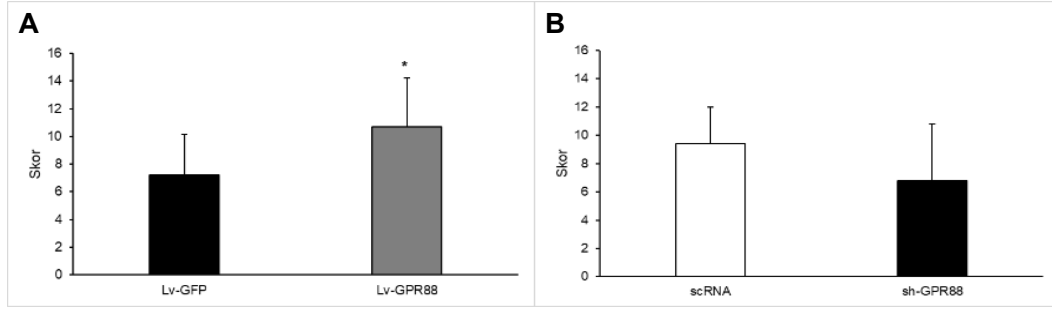
Şekil 6.3.1: Bederson nörolojik skorlarının değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Elde edilen bulgularda GPR88'in aşırı ifadesinde bir miktar skor düşse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.1.A). Ayrıca GPR88'in baskılandığı grup için elde edilende verilerde nörolojik etkilerde kötüye gidiş gözlemse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.1.B).

6.3.1.2. Modifiye edilmiş Garcia skorlaması

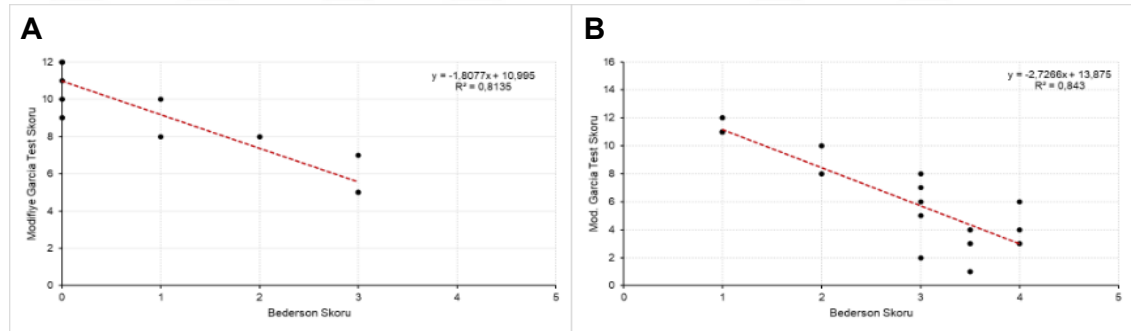
Modifiye edilmiş Garcia testi sonuçları, 60 dakika MCAO sonrası nörolojik fonksiyonların değerlendirilmesinde önemli veriler sağlamıştır. Test kapsamında ölçülen spontan aktivite, dört uzvun hareket simetrisi, ön pati uzatma ve vücut

proprioepsiyonu gibi parametreler arasında, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında deney gruplarında belirgin farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 6.3.2: Modifiye edilmiş Garcia testi ile nörolojik fonksiyon değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

GPR88'in ekspresyonunun artırıldığı gruplarda nörolojik skorların anlamlı şekilde iyileştiği ($p=0.030$) (Şekil 6.3.2.A), buna karşılık inhibisyon gruplarında nörolojik fonksiyon kaybının belirgin olduğu ancak istatistiksel olarak fark bulunamadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Şekil 6.3.2.B).



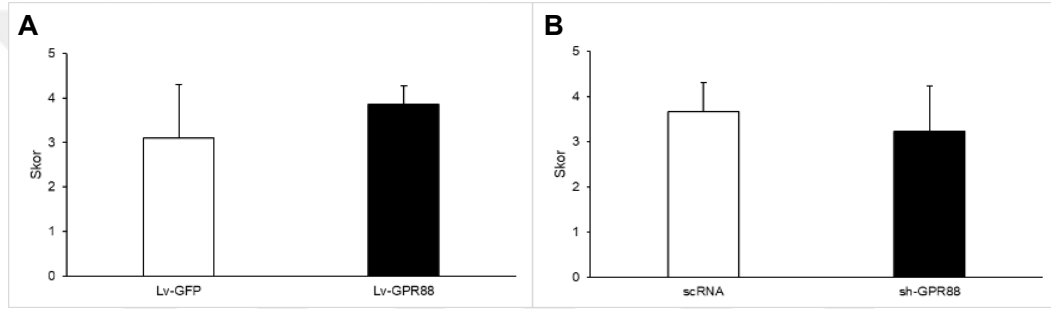
Şekil 6.3.3: Bederson skoru ve modifiye Garcia testi skorları arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Modifiye edilmiş Garcia testi ile Bederson skorları arasında yapılan korelasyon analizi, iki yöntemin nörolojik fonksiyon bozukluklarını değerlendirmede yüksek bir paralellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Analiz sonuçları, modifiye edilmiş Garcia

testi puanları ile Bederson skorları arasında hem GPR88'in ifadesinin artırıldığı grupta ($R^2=0.81$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.3.A), hem de baskılandığı grupta ($R^2=0.84$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.3.B) anlamlı ve ters yönlü bir ilişki olduğunu göstermiştir.

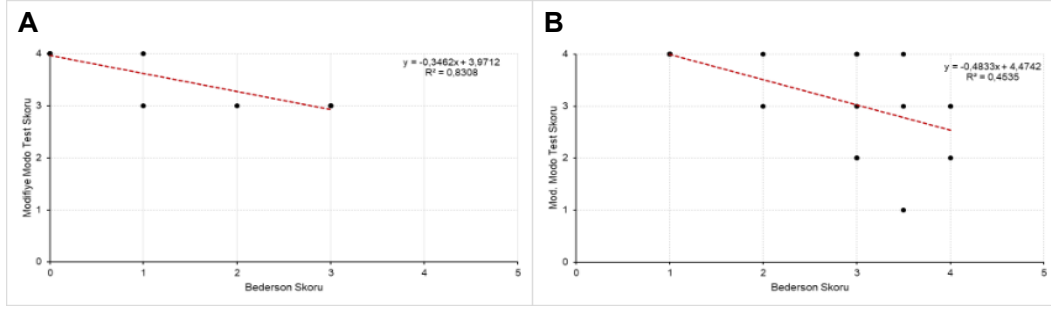
6.3.1.3. Modifiye edilmiş Modo skorlaması

Modifiye edilmiş Modo testi sonuçları, 60 dakika MCAO sonrası nörolojik fonksiyon kayıplarının değerlendirilmesinde önemli bir ölçüt sağlamıştır. Testte değerlendirilen spontan motilite, doğrulma refleksi ve kavrama refleksi parametreleri arasında, GPR88'in ekspresyon düzeyine bağlı olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.



Şekil 6.3.4: Modifiye edilmiş Modo testi ile motor fonksiyon değerlendirmesi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

GPR88 ekspresyonunun artırıldığı gruplarda reflekslerin daha iyi korunduğu ve spontan motilitenin iyileştiği gözlenirken istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.4.A). GPR88 inhibisyonu yapılan gruplarda bu fonksiyonların belirgin şekilde bozulduğu gözlemlense de istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.4.B).

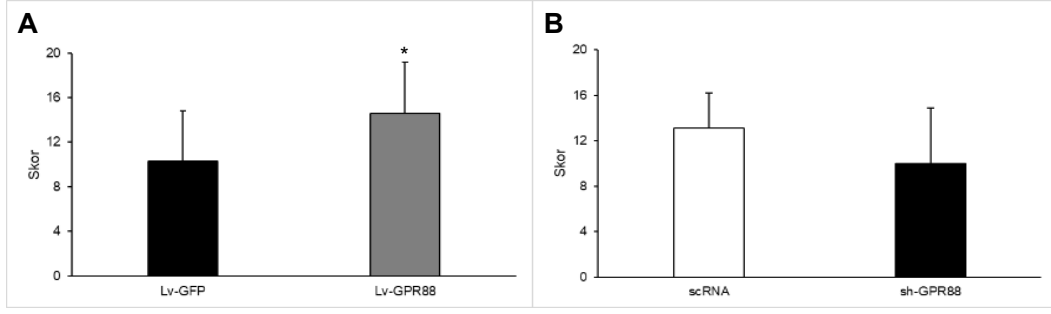


Şekil 6.3.5: Bederson skoru ve modifiye Modo testi skorları arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Modifiye edilmiş Modo testi ile Bederson skorları arasında yapılan korelasyon analizi, iki yöntemin nörolojik fonksiyon bozukluklarını değerlendirmede yüksek bir paralellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Analiz sonuçları, modifiye edilmiş Modo testi puanları ile Bederson skorları arasında hem GPR88'in ifadesinin artırıldığı grupta ($R^2=0.83$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.5.A), hem de baskılandığı grupta ($R^2=0.45$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.5.B) anlamlı ve ters yönlü bir ilişki olduğunu göstermiştir.

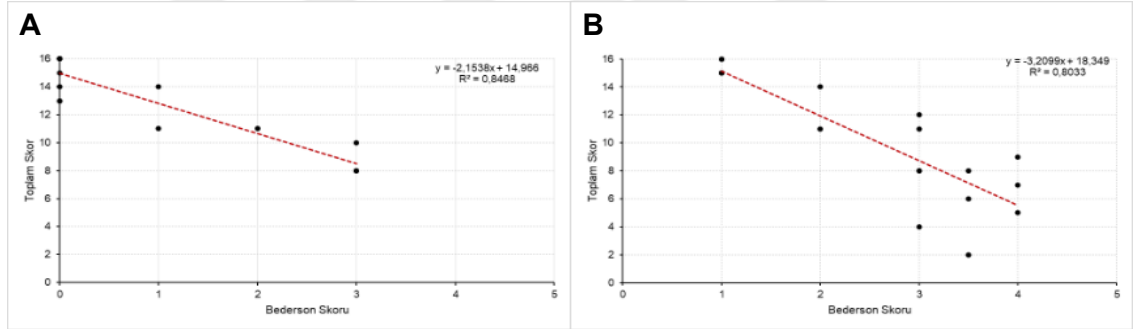
6.3.1.4. Modifiye edilmiş Toplam skorlama

Çalışmamızda, nörolojik fonksiyon kayıplarının daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi için modifiye edilmiş Garcia skoru ve modifiye edilmiş Modo skoru birleştirilerek total skor hesaplanmıştır. Bu yaklaşım, her iki testin farklı parametreleri değerlendirmesi sayesinde, motor becerilerden spontan aktiviteye, reflekslerden proprioseptif yanıtlara kadar geniş bir nörolojik fonksiyon yelpazesini kapsayarak daha kapsamlı bir analiz sağlamıştır.



Şekil 6.3.6: Modifiye edilmiş Toplam skor ile motor fonksiyon değerlendirmesi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

GPR88'in ekspresyonunun artırıldığı gruplarda nörolojik skorların anlamlı şekilde iyileştiği ($p = 0.040$) (Şekil 6.3.6.A), buna karşılık inhibisyon gruplarında nörolojik fonksiyon kaybının belirgin olduğu ancak istatistiksel olarak fark bulunamadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 6.3.6.B).



Şekil 6.3.7: Bederson skoru ve modifiye edilmiş Toplam Skor arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

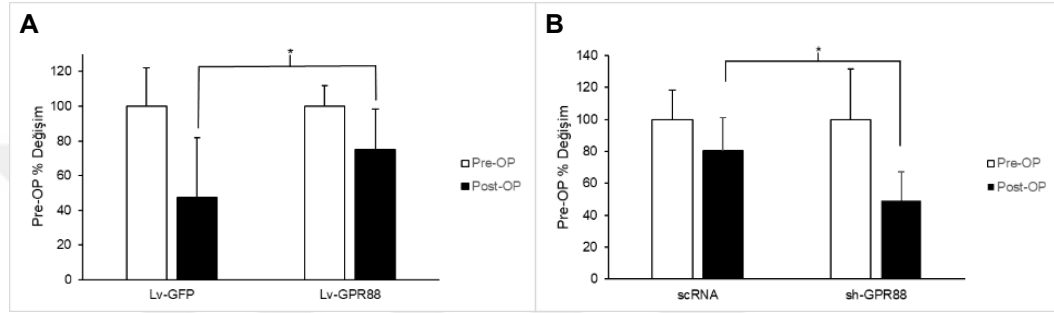
Modifiye edilmiş Toplam skor ile Bederson skorları arasında yapılan korelasyon analizi, iki yöntemin nörolojik fonksiyon bozukluklarını değerlendirmede yüksek bir paralellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Analiz sonuçları incelendiğinde modifiye edilmiş Garcia ve Mado skorlarının birleştirilmesiyle elde edilen toplam skorun Bederson skorları arasında hem GPR88'in ifadesinin arttırıldığı grupta

($R^2=0.85$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.7.A), hem de baskılandığı grupta ($R^2=0.80$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.7.B) anlamlı ve ters yönlü bir ilişki olduğunu göstermiştir.

6.3.2. 30 dakika MCAO modelinde GPR88'in Nörolojik Etkileri

6.3.2.1. Alınan mesafe üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modelini takiben 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin toplam hareket mesafeleri değerlendirilmiştir.

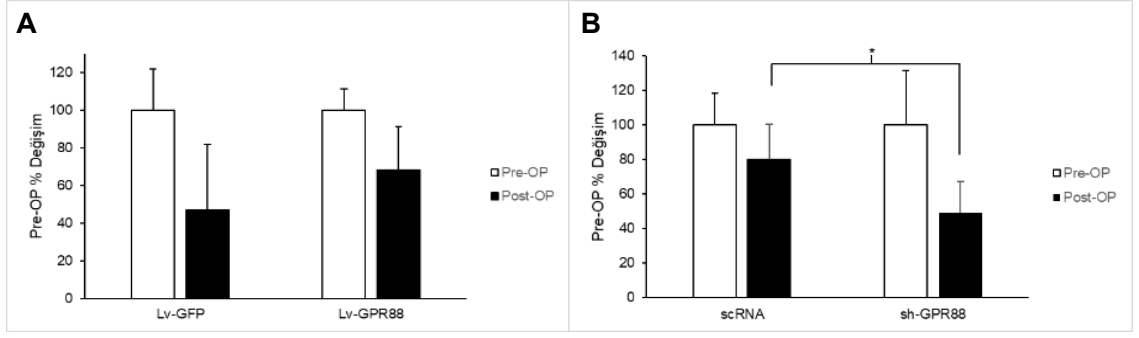


Şekil 6.3.8: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) toplam mesafe değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

GPR88 aşırı ifade grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha uzun bir mesafe kat edildiği gözlemlenmiştir ($p=0.040$) (Şekil 6.3.8.A). Bu bulgu, GPR88'in serebral iskemi sonrası motor aktiviteyi ve keşif davranışını desteklediğine işaret etmektedir. Öte yandan, GPR88 baskılama grubunda, toplam alınan mesafenin kontrol grubuna ve aşırı ifade grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p=0.037$) (Şekil 6.3.8.B). Baskılama grubundaki bu düşüş, motor fonksiyonların ve hareket yetisinin zayıfladığını göstermektedir.

6.3.2.2. Ortalama hız üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin ortalama hız değerleri analiz edilmiştir.

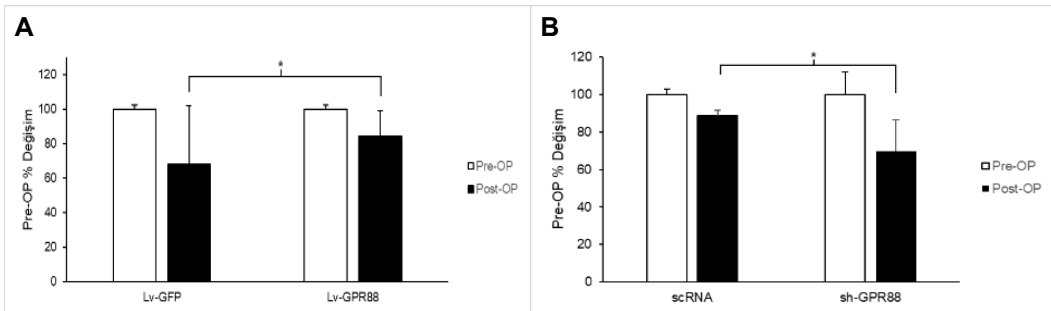


Şekil 6.3.9: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) ortalama hız değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

GPR88 aşırı ifade grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ortalama hız gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 6.3.9.A). Buna karşılık, GPR88 baskılama grubunda, ortalama hız değerleri kontrol grubuna göre belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur ($p = 0.039$) (Şekil 6.3.9.B). Baskılama grubundaki bu azalma, motor becerilerdeki bozulmayı ve hareket kabiliyetindeki kısıtlamayı yansıtmaktadır.

6.3.2.3. Hareketli geçirilen süre üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerde hareketli geçirilen süre analiz edilmiştir.



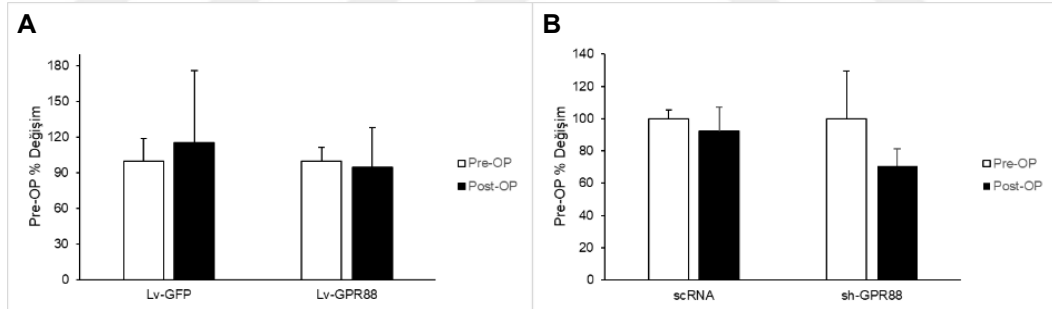
Şekil 6.3.10: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) hareketli geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

GPR88 aşırı ifade grubunda, farelerin hareketli geçirdiği sürenin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha uzun olduğu gözlenmiştir ($p=0.037$) (Şekil 6.3.10.A). Bu sonuç, GPR88'in motor aktiviteyi ve davranışsal iyileşmeyi desteklediğini göstermektedir. Buna karşılık, GPR88 baskılama grubunda hareketli geçirilen sürenin hem kontrol grubuna hem de aşırı ifade grubuna göre belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p=0.036$) (Şekil 6.3.10.B). Bu durum, baskılama grubundaki farelerin motor yeteneklerinin ve aktif hareketliliğinin ciddi şekilde kısıtlandığını yansıtmaktadır.

6.3.2.4. Rotasyon sayısı üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin rotasyon sayıları analiz edilmiştir. Rotasyon davranışı, serebral iskemisi sonrası beyin asimetrisinin bir yansıması olarak değerlendirilir ve genellikle motor kontrolü etkileyen unilateral lezyonların göstergesi olarak kabul edilir.

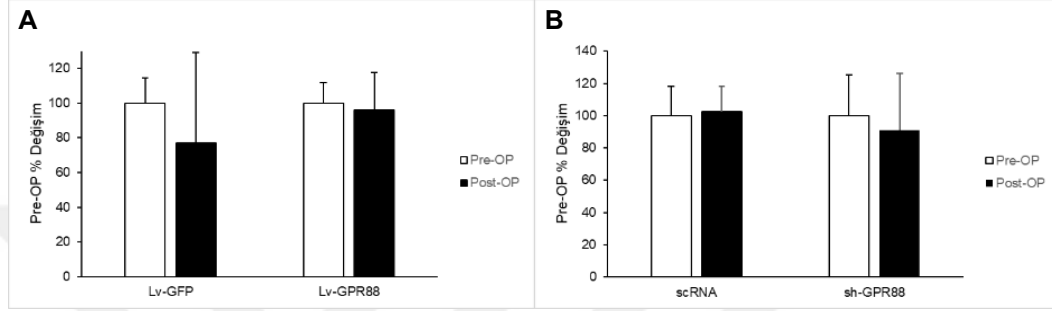


Şekil 6.3.11: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) yapılan rotasyon sayısı değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) ($*p<0.05$, $**p<0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Çalışmamızda, GPR88'in hem aşırı ifade hem de baskılama gruplarının kontrolleri kıyaslandığında aralarında rotasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 6.3.11).

6.3.2.5. Kenar bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin kenar bölgesinde geçirdikleri süre analiz edilmiştir. Kenar bölgesinde geçirilen süre genellikle hayvanların keşif davranışları ve anksiyete düzeyleriyle ilişkilendirilmekte olup, serebral iskemi sonrası nörolojik hasarın davranışsal etkilerinden biri olarak değerlendirilir.

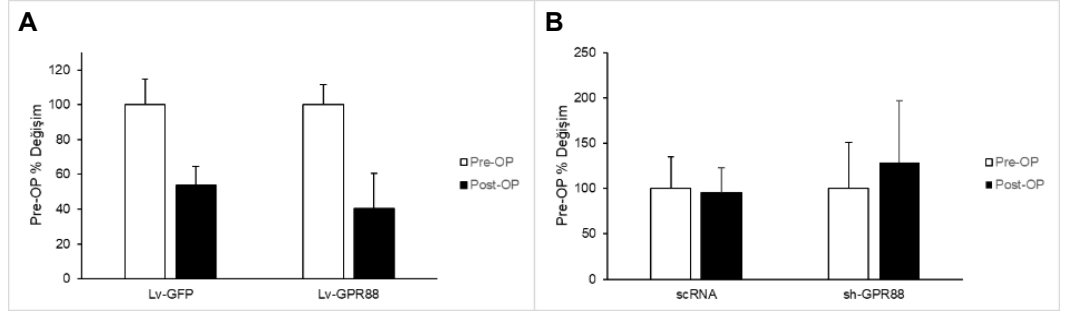


Şekil 6.3.12: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) kenar bölgesinde geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Çalışmamızda, GPR88'in hem aşırı ifade hem de baskılama gruplarının kontrolleri kıyaslandığında aralarında rotasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 6.3.12).

6.3.2.6. Geçiş bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin geçiş bölgesinde geçirdikleri süre analiz edilmiştir. Geçiş bölgesinde geçirilen süre genellikle hayvanların keşif davranışı ve motor hareketliliklerini değerlendirmek için kullanılan bir parametre olup, serebral iskemi sonrası nörolojik hasarın davranışsal etkilerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

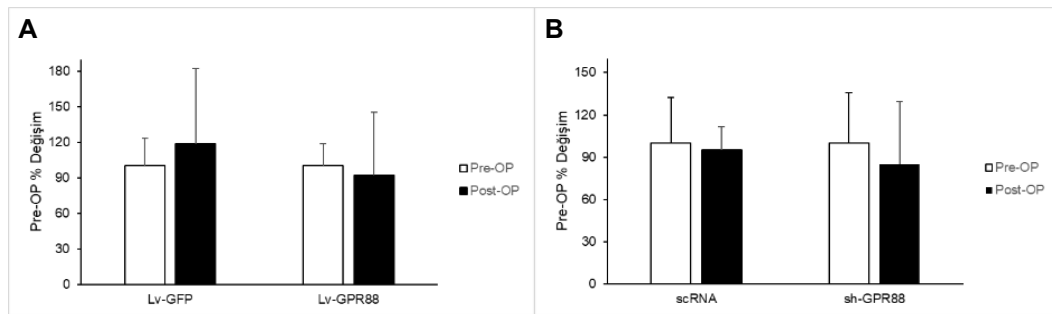


Şekil 6.3.13: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) geçiş bölgesinde geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Çalışmamızda, GPR88'in hem aşırı ifade hem de baskılama gruplarının kontrolleri kıyaslandığında aralarında rotasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 6.3.13).

6.3.2.7. Merkez bölgesinde geçirilen süre üzerine etkisi

Açık alan testinde, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin merkez bölgesinde geçirdikleri süre analiz edilmiştir. Merkez bölgesinde geçirilen süre, genellikle hayvanların anksiyete düzeylerini ve keşif davranışlarını değerlendirmek için kullanılan bir parametredir.



Şekil 6.3.14: Açık alan testinde pre-operatif (Pre-OP) ve post-operatif (Post-OP) merkez bölgesinde geçirilen süre değerlendirmesi (30 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-

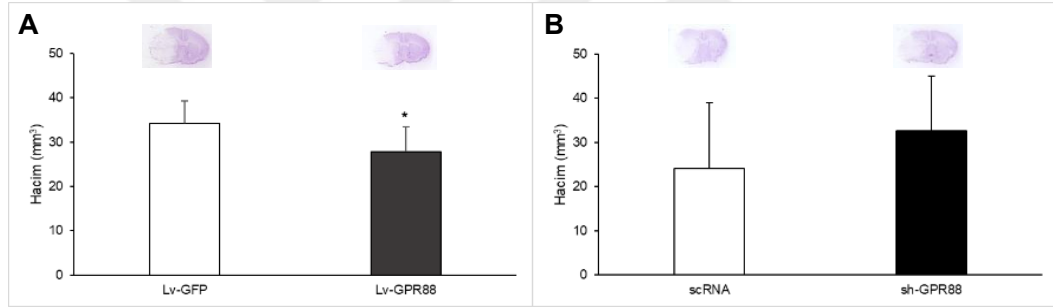
GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Çalışmamızda, GPR88'in hem aşırı ifade hem de baskılama gruplarının kontrolleri kıyaslandığında aralarında rotasyon sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 6.3.14).

6.4. GPR88'in Hasar ve Ödem Hacmi Üzerine Etkisi

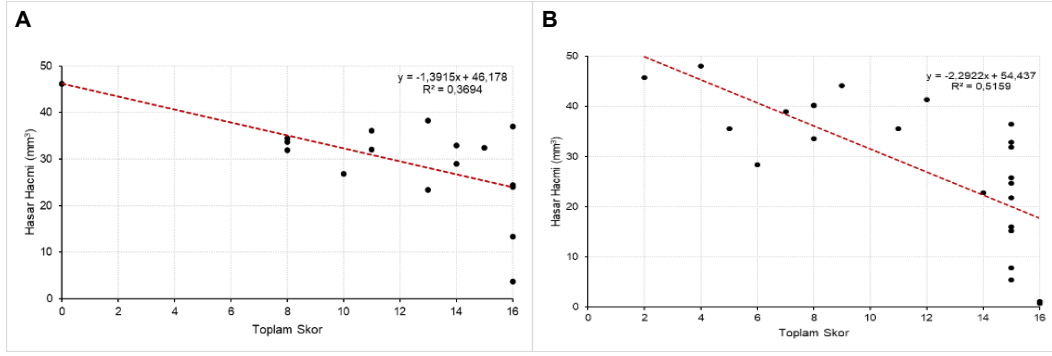
6.4.1. Hasar hacmi analizi

Hasar hacmi analizi, 60 dakika MCAO modeli kullanılarak her iki ana grup (GPR88 aşırı ifade grubu ve GPR88 baskılama grubu) için gerçekleştirildi. Cresyl violet boyaması ile belirlenen hasar hacimleri, deney gruplarının karşılaştırmalı değerlendirilmesinde önemli sonuçlar sunmuştur.



Şekil 6.4.1: Cresyl violet boyaması ile 60 dakika MCAO modeli sonrası hasar hacmi değerlendirmesi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Aşırı ifade grubunda, GPR88'in nöroprotektif etkisinin bir göstergesi olarak hasar hacminde anlamlı bir azalma gözlenirken ($p=0.012$) (Şekil 6.4.1.A), baskılama grubunda ise hasar hacminin kontrol grubuna kıyasla arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) (Şekil 6.4.1.B) tespit edilmiştir.

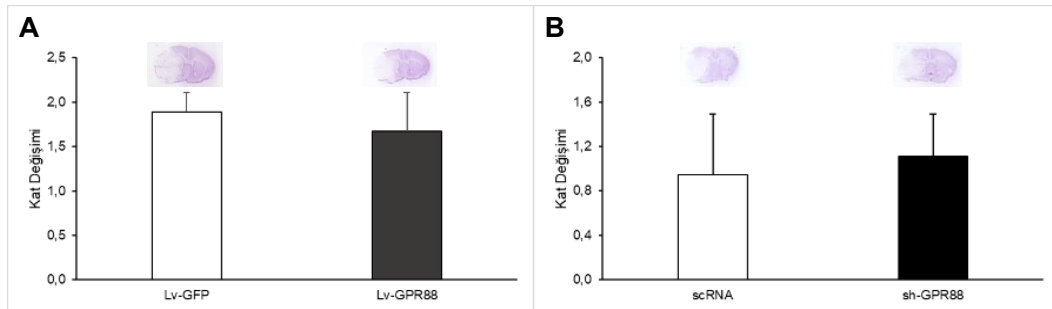


Şekil 6.4.2: Toplam skor ve hasar hacmi arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Ayrıca, hasar hacmi sonuçları ile toplam nörolojik skorlar karşılaştırıldığında, hasar hacmi ve toplam skor arasında ters yönlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Aşırı ifade grubunda daha düşük hasar hacmi ve daha yüksek nörolojik skorlar gözlenirken ($R^2=0.37$, $p=0.010$) (Şekil 6.4.2.A), baskılama grubunda hasar hacmi artışıyla birlikte nörolojik skorların düşüşü dikkat çekmiştir ($R^2=0.52$, $p=0.000$) (Şekil 6.4.2.B).

6.4.2. Ödem analizi

Ödem analizi, 60 dakika MCAO modeli kapsamında GPR88 aşırı ifade ve baskılama gruplarını değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Cresyl violet boyaması ile ölçülen beyin ödemi hacimleri, deney grupları arasında belirgin farklılıklar ortaya koymuştur.



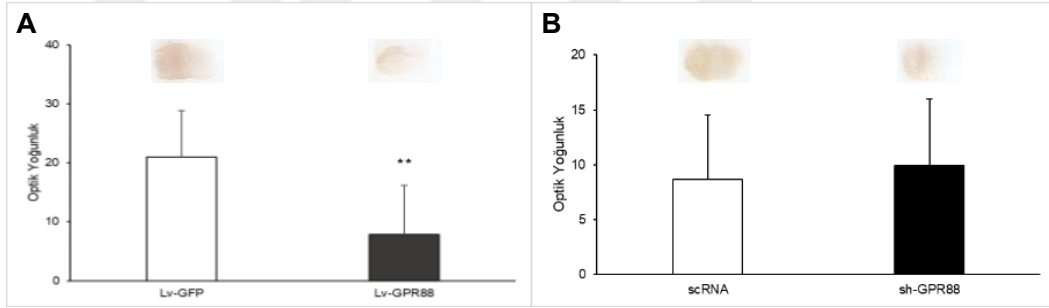
Şekil 6.4.3: Cresyl violet boyaması ile 60 dakika MCAO modeli sonrası ödem değerlendirilmesi. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve

kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Aşırı ifade grubunda, GPR88'in potansiyel nöroprotektif etkisi ödem hacminde bir azalma gösterse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.4.3.A). Ayrıca baskılama grubunda da ödem hacminin kontrol grubuna kıyasla bir artış gösterdiği ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.4.3.B).

6.5. GPR88'in Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği Üzerine Etkisi

Kan-beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği, 60 dakika MCAO modeli sonrası GPR88'in aşırı ifade ve baskılama gruplarındaki etkisini değerlendirmek için analiz edilmiştir.

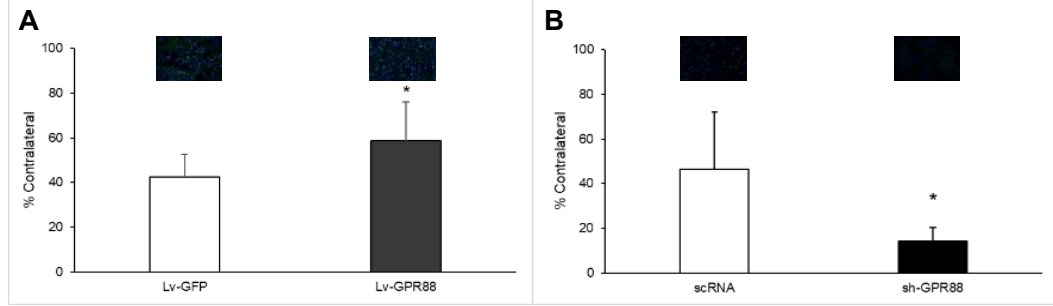


Şekil 6.5.1: IgG ekstravazasyonu ile kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi (60 dakika MCAO modeli) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

İmmunoglobulin G (IgG) boyaması kullanılarak yapılan analizlerde, GPR88 aşırı ifade grubunda KBB geçirgenliğinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.002$) (Şekil 6.5.1.A). Bu durum, GPR88'in serebral iskemi sonrası KBB bütünlüğünü koruyucu etkisine işaret etmektedir. Öte yandan, baskılama grubunda KBB geçirgenliğinin arttığı ve bu artışın kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Şekil 6.5.1.B).

6.6. GPR88'in Nöronal Sağkalım Üzerine Etkisi

Nöronal sağkalım, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerde NeuN boyaması ile değerlendirildi.

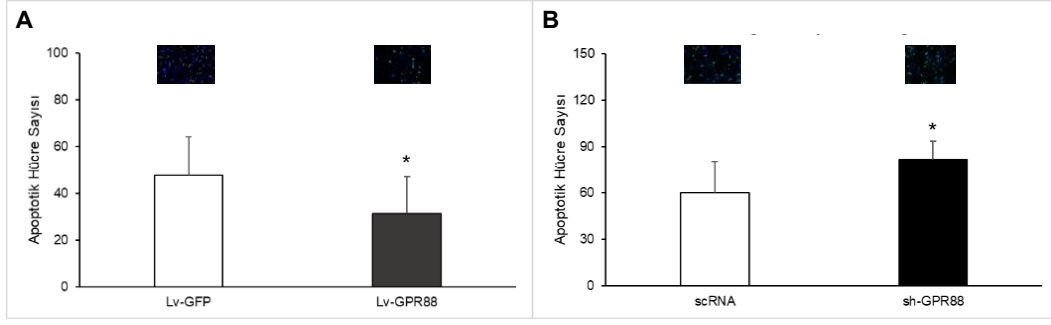


Şekil 6.6.1: NeuN boyaması ile nöronal sağkalım değerlendirmesi (60 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Yapılan hücre sayımları, GPR88 aşırı ifade grubunda nöronal sağkalımın kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını gösterdi ($p=0.035$) (Şekil 6.6.1.A). Bu bulgu, GPR88'in serebral iskemi sonrası nöronal koruma sağladığını ve nöronal sağkalımı desteklediğini göstermektedir. Benzer şekilde, GPR88 baskılama grubunda nöronal sağkalım oranlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p=0.014$) (Şekil 6.6.1.B). Baskılama grubunda gözlenen bu düşüş, GPR88'in eksikliğinin nöronal kaybı artırabileceğini ve bu proteinin serebral iskemi sonrası nöronların korunmasında kritik bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

6.7. GPR88'in Apoptotik Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

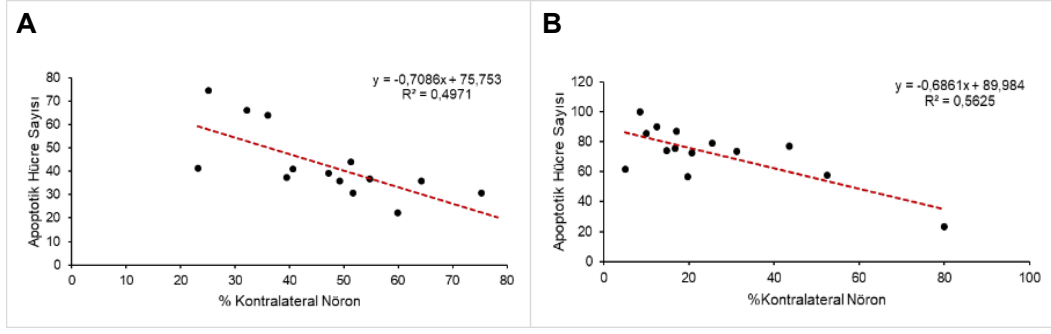
Apoptotik hücre sayısı, 30 dakika MCAO modeli sonrası 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerde TUNEL assay yöntemiyle analiz edilmiştir.



Şekil 6.7.1: TUNEL boyaması ile DNA fragmentasyonu ve apoptotik hücre sayısı değerlendirmesi (60 dakika MCAO modeli) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Yapılan değerlendirmelerde, GPR88 aşırı ifade grubunda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p=0.020$) (Şekil 6.7.1.A). Bu bulgu, GPR88'in serebral iskemi sonrası nöronal apoptozu baskılayıcı etkisini ve hücresel düzeyde sağladığı korumayı desteklemektedir. Öte yandan, GPR88 baskılama grubunda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0.026$) (Şekil 6.7.1.B). Bu sonuç, GPR88'in eksikliğinin apoptotik süreçleri hızlandırarak nöronal kayıpları artırabileceğini ve bu proteinin serebral iskemi sonrası apoptotik hücre ölümünü sınırlandırmada kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Nöronal sağkalım ve apoptotik hücre sayısı arasında yapılan korelasyon analizi, GPR88 aşırı ifade ve baskılama gruplarını kapsayacak şekilde değerlendirilmiş ve bu iki parametrenin serebral iskemi sonrası hücresel hasar ve iyileşmeyi anlamada birbirleriyle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 6.7.2: DNA fragmentasyonu ve nöronal sağkalım arasındaki korelasyon analizi (60 dakika MCAO modeli). (A) GPR88 aşırı ifade grubu (Lv-GPR88) ve kontrol grubu (Lv-GFP) karşılaştırması. (B) GPR88 baskılama grubu (shGPR88) ve kontrol grubu (scRNA) karşılaştırması.

Analiz sonuçlarına göre, nöronal sağkalım ile apoptotik hücre sayısı arasında hem aşırı ifade grubunda ($R^2=0.50$, $p=0.005$) (Şekil 6.7.2.A) hem de baskılama grubunda ($R^2=0.56$, $p=0.002$) (Şekil 6.7.2.B) anlamlı ve ters yönlü bir ilişki bulunmuştur. Aşırı ifade grubunda, daha yüksek nöronal sağkalım oranlarının daha düşük apoptotik hücre sayılarıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum, GPR88'in aşırı ekspresyonunun, nöronal sağkalımı desteklerken apoptotik hücre ölümünü etkili bir şekilde sınırladığını göstermektedir.

7. TARTIŞMA

Beynin kan akışının azaldığı bir durum olan serebral iskemi, ciddi ve potansiyel olarak yaşamı tehdit edici etkilere sahip olabilir. Altta yatan mekanizmaların araştırılması ve potansiyel tedavilerin keşfedilmesi çok önemlidir. Bu bağlamda, yetim G protein-bağlı reseptör GPR88 çalışma için umut verici bir hedeftir (4,6).

Bu çalışmanın amacı, bir serebral iskemi modelinde GPR88'in aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının etkilerini araştırmaktır (4,6). GPR88 aktivitesinin modüle edilmesinin, iskemik beyin hasarına dahil olan patofizyolojik süreçleri önemli ölçüde etkileyeceğini varsayıyoruz. Bu çalışma, GPR88'in serebral iskemi sırasında hücrel ve nörolojik işlevlerin düzenlenmesindeki rolüne ilişkin yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine yol açabilecek içgörüler sağlamayı amaçladığı için önemlidir.

G-proteinine bağlı reseptör GPR88, çeşitli nörolojik süreçlere potansiyel katılımı nedeniyle sinirbilim alanında önemli bir ilgi görmüştür (42,44). Çok sayıda çalışma, motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçler için çok önemli bir beyin bölgesi olan striatumda GPR88'in dağılımını ve düzenlenmesini araştırmıştır (4,6,42,44). Gpr88 mRNA ekspresyonunun yetişkin beyninde oldukça sınırlı olduğu, striatum ve olfaktör tüberkülda belirgin bir varlığı olduğu bulunmuştur (44). Ayrıca, qRT-PCR analizi, Gpr88Cre/Cre farelerde Gpr88^{+/+} ve Gpr88Cre/+ farelere kıyasla Gpr88 ifadesinin önemli ölçüde yukarı regülasyonunu doğrulamıştır (44). GPR88 aşırı ifadesinin doğrulanması için yapılan PCR analizlerinde, lentiviral vektörlerin taşıdığı GPR88 geninin kodlama bölgesi başarıyla amplifiye edilmiştir. Bu, lentiviral vektörlerin hedef geni etkin bir şekilde taşıdığını ve hücrel düzeyde GPR88 ekspresyonunu artırdığını göstermektedir (Şekil 5.2.3) (Şekil 6.1.1.A). PCR sonuçları, HeLa hücre hattında ve fare striatumunda lentiviral vektörlerin enfeksiyon sonrası yüksek GPR88 mRNA seviyeleri ürettiğini doğrulamaktadır (Şekil 6.1.2). GPR88'i hedeflemenin potansiyel terapötik uygulamalarını daha fazla araştırmak için, bu çalışma aynı zamanda striatumda lentiviral vektörler kullanarak bu reseptörün shRNA aracılı baskılanmasının etkilerini araştırmıştır (49). Çalışma, çeşitli nörolojik

bozukluklarda gözlenen önemli bir patolojik özellik olan striatumdaki hücrel hasar üzerinde azalmış GPR88 ifadesinin etkisini belirlemeyi amaçlamıştır. GPR88 geninin ekspresyon seviyelerini azaltmak amacıyla shRNA lentiviral vektörleri kullanılmıştır. shRNA lentiviral vektörleri, GPR88 mRNA'sını hedef alarak gen susturma mekanizması (RNA interferansı) yoluyla GPR88 protein seviyelerini azaltmıştır. Üç farklı plazmid (shGPR88-1, shGPR88-2, shGPR88-3) test edilmiş ve bu plazmidlerin GPR88 seviyelerini etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Şekil 6.1.4). shGPR88-1 plazmidini, GPR88 seviyelerini en fazla düşüren aday olarak seçilmiş ve çalışmanın geri kalanında kullanılmıştır (p=0.000). Bu durum, shRNA lentiviral vektörlerinin hedef gen inhibisyonunda güvenilir ve etkili olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 6.1.3).

GPR88'in aşırı ekspresyonunu daha fazla doğrulamak için Western blot analizi kullanılabilir. Bu teknik, GPR88 protein seviyelerinin ölçülmesine olanak tanıyarak reseptörün artan ifadesine dair doğrudan kanıt sağlar. Lentiviral vektörler, merkezi sinir sisteminde hedeflenmiş gen iletimi ve ifadesi için umut verici bir araç olarak ortaya çıkmıştır (50). Bu vektörler, striatumdaki hücrelerin transdüksiyonunda etkinlik göstermiştir ve bu da onları bu beyin bölgesinde GPR88'in işlevsel rollerini araştırmak için uygun bir yaklaşım haline getirmektedir. Western blot analizi, GPR88 proteininin aşırı ifade grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur (p=0.002) (Şekil 6.1.2). Özellikle striatum bölgesinde gözlemlenen bu artış, GPR88'in spesifik olarak hedef dokuda yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermektedir (Şekil 6.1.1.B). Lentiviral vektör enfeksiyonu sonrası GFP sinyalleri, aşırı ifadenin başarılı bir şekilde hem hücrel düzeyde hem de proteomik seviyede doğrulandığını işaret etmektedir. Lentiviral vektörlerin etkinliği, enfekte edilen hücrelerde GFP pozitif sinyallerin floresan mikroskopi ile tespit edilmesiyle gösterilmiştir. Bu, lentiviral vektörlerin hedef hücrelere başarılı bir şekilde ulaştığını ve gen aktarımının gerçekleştiğini doğrulamaktadır (Şekil 6.1.1.A). Fare beynine yapılan enjeksiyonların ardından GFP pozitif hücrelerin striatumda lokalize olduğu gözlenmiştir. Bu durum, lentiviral vektörlerin hedef dokularda spesifik olarak etkinlik gösterdiğini ve istenen genin doğru bölgeye taşındığını kanıtlamaktadır. Striatum bölgesinde yapılan moleküler analizler, GPR88'in spesifik olarak bu bölgede yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermiştir. Lentiviral vektörlerin hedef dokuda lokalize

olduğunu doğrulayan bu sonuçlar, hem moleküler hem de dokusal düzeyde yüksek bir etkinlik sergilenmesini sağlamıştır (Şekil 6.1.1.B). Ayrıca Western blot analizleri, lentiviral vektörlerin HeLa hücre hattında ve fare striatum bölgesinde GPR88 protein seviyelerinde belirgin bir azalma sağladığını da göstermiştir (Şekil 6.1.4). Özellikle Western blot sonuçları, striatumdaki GPR88 seviyelerinin lentiviral vektörler aracılığıyla artırıldığını istatistiksel olarak doğrulamaktadır. Bu bulgular, striatumun GPR88'in etkilerini değerlendirmek için uygun bir model olduğunu desteklemektedir.

Çok sayıda çalışma, GPR88'in motor ve duygusal davranışların düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (4). GPR88'den yoksun fareler hiperlokomosyon, artan stereotipiler ve motor koordinasyon ve öğrenme eksiklikleri sergileyerek bu reseptörün striatal dopamin fonksiyonunu kontrol etmedeki önemini gösterir. Ek olarak, bir çalışma dorsal striatumda GPR88'in yıkılmasının orta dikenli nöronların dopamin kaybına tepkisini değiştirdiğini ve GPR88'in Parkinson hastalığında potansiyel bir rolü olduğunu düşündüğünü bulmuştur (49).

GPR88'in etkilerini araştırmak için, nörolojik bozuklukların hayvan modellerinde nörolojik gelişmeleri değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan modifiye Garcia ve Modo testlerini kullandık. Modifiye Garcia testi spontan aktivite, dört uzuv hareketinde simetri, tırmanma, vücut propriyosepsiyonu ve vibrissae dokunma tepkisi dahil olmak üzere çeşitli nörolojik fonksiyonları değerlendirir (51). Modo testi ise ön bacak fonksiyonu, arka bacak fonksiyonu, daire çizme davranışı ve dengeyi değerlendirmeye odaklanır (51). GPR88'in aşırı ifadesi, spontan aktivite, uzuv hareketlerinin simetrisi, ön pati uzatma ve vücut propriyosepsiyonu gibi parametrelerde kontrol grubuna kıyasla belirgin iyileşmelere yol açmıştır. 60 dakikalık MCAO modeli sonrası GPR88'in aşırı ifadesi modifiye edilmiş Garcia test ile elde edilen nörolojik skorları anlamlı şekilde iyileştirmiştir ($p=0.030$) (Şekil 6.3.2.A). Modifiye Garcia skoru ile Bederson skorları arasında anlamlı ve ters yönlü bir ilişki bulunmuştur ($R^2=0.81$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.3.A). Bu, GPR88'in nörolojik fonksiyonları iyileştirme kapasitesini vurgulamaktadır. GPR88 aşırı ifadesi, spontan motilite, doğrulma refleksi ve kavrama refleksi gibi parametrelerde kontrol grubuna göre iyileşme sağlamıştır. Bu parametreler, iskemi sonrası motor becerilerin korunmasında GPR88'in etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 6.3.4.A). Modifiye Modo testi sonuçlarıyla Bederson

skorları arasında benzer şekilde güçlü bir ters korelasyon gözlenmiştir ($R^2=0.83$, $p=0.000$) (Şekil 6.3.5.A). Bu durum, GPR88'in motor becerileri iyileştirici etkisini desteklemektedir. Modifiye Garcia ve Modo testlerindeki iyileşmeler, GPR88'in aşırı ifadesinin nörolojik fonksiyonları desteklediğini ve iskemi sonrası nöroprotektif bir etki sağladığını göstermektedir. Korelasyon analizleri, bu etkilerin hem motor beceriler hem de nörolojik iyileşme açısından tutarlı olduğunu doğrulamaktadır. Baskılama grubunda spontan aktivite, uzuv hareket simetrisi, ön pati uzatma ve vücut propriosepsiyonu parametrelerinde bozulmalar gözlenmiştir. Spontan aktivite düzeyi düşmüş, baskılama grubundaki farelerin hareketlilikte tereddüt yaşadığı ve kafes içinde keşif davranışının azaldığı görülmüştür. Uzuv hareketlerinin simetrisinde asimetri gözlenmiş, özellikle iskemi sonrası sol tarafta motor fonksiyon kaybı kaydedilmiştir (Şekil 6.3.4.A). Baskılama grubunda nörolojik skorlar kontrol grubuna kıyasla düşmüş, ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.2.B). Bu durum, GPR88'in baskılanmasının nörolojik fonksiyonlar üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu, ancak belirli varyasyonların sonuçlara etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Baskılama grubunda spontan hareketlilik belirgin şekilde azalmış, farelerin hareket başlatma süreleri uzamış ve hareket kabiliyetleri ciddi anlamda kısıtlanmıştır. Bunun yanında farelerde doğrulma refleksinde gecikmeler ve yetersizlikler gözlenmiştir. Bu durum, motor kontrol yetisindeki bozulmanın bir göstergesidir. Ayrıca Kavrama refleksi, baskılama grubunda zayıflamış ve uzuvların çubuklara tutunma gücünde azalma tespit edilmiştir. GPR88 baskılanması motor fonksiyonların ve reflekslerin ciddi şekilde bozulmasına neden olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.4.B). Bu durum, GPR88'in motor fonksiyonların korunmasında rol oynadığını ancak daha büyük örneklem gruplarıyla bu etkinin daha net ortaya konabileceğini düşündürmektedir.

Bu nörolojik değerlendirmelere ek olarak, GPR88 aşırı ekspresyonunun motor fonksiyonlar üzerindeki etkisini incelemek için bir açık alan testi de gerçekleştirdik. GPR88 aşırı ifade grubunda fareler, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha uzun mesafeler kat etmişlerdir ($p=0.040$) (Şekil 6.3.8.A). Bu bulgu, iskemi sonrası motor aktivitenin ve keşif davranışının desteklendiğini göstermektedir. Ortalama hız, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş ancak istatistiksel anlamlılık

taşımamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.3.9.A). Bu durum, motor aktiviteye pozitif bir etki olduğunu ancak bu etkinin hız yerine toplam hareket mesafesi üzerinde daha belirgin olduğunu düşündürmektedir. Aşırı ifade grubunda fareler, kontrol grubuna kıyasla hareketli olarak daha fazla zaman geçirmiştir ($p=0.037$) (Şekil 6.3.10.A). Bu sonuç, motor yeteneklerdeki iyileşmeyi ve davranışsal aktivitenin arttığını desteklemektedir. Baskılama grubunda toplam hareket mesafesi, kontrol grubuna ve GPR88 aşırı ifade grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p=0.037$) (Şekil 6.3.8.B). Bu bulgu, motor aktivite yetisinin ciddi şekilde bozulduğunu ve baskılama grubundaki farelerin daha az hareket ettiğini göstermektedir. Ortalama hız değerleri baskılama grubunda kontrol grubuna göre belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur ($p=0.039$) (Şekil 6.3.9.B). Bu durum, hareket yetisindeki genel yavaşlamayı ve motor fonksiyon kaybını yansıtmaktadır. Baskılama grubunda hareketli geçirilen süre, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0.036$) (Şekil 6.3.10.B). Bu, farelerin motor aktivite yetisinin ve keşif davranışının baskılanmasıyla birlikte azaldığını göstermektedir. Açık alan testi bulguları, GPR88'in motor fonksiyonları iyileştirdiğini ve farelerin davranışsal aktivitesini artırdığını ortaya koymaktadır. Özellikle toplam hareket mesafesi ve hareketli geçirilen süre parametreleri bu iyileşmenin güçlü göstergeleridir. GPR88 aşırı ifadesi, serebral iskemi sonrası hem motor hem de nörolojik fonksiyonlarda iyileşmeyi destekleyen terapötik bir hedef olarak değerlendirilebilir. Bu bulgular, iskemi sonrası GPR88'in potansiyel bir tedavi aracı olabileceğini önermektedir.

Hasar hacmi, nöronal sağkalım ve apoptoz için yaptığımız testlerden elde edilen bulgularımız GPR88'in aşırı ekspresyonunun beyin lezyonlarının hacmini önemli ölçüde azalttığını ve apoptotik hücrelerin sayısını azalttığını ve aynı zamanda nöronların hayatta kalmasını arttırdığını göstermektedir (4,6). Motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçlerle ilişkili önemli bir beyin bölgesi olan striatum, GPR88'in en yüksek ve en kısıtlı ifadesini sergilemektedir (6). GPR88 genindeki homozigot zararlı mutasyonlar, çocukluk koresi, öğrenme güçlüğü ve konuşma geriliği ile karakterize ailesel bir gelişim bozukluğuyla ilişkilendirilmiştir ve bu reseptörün uygun nöronal işlevdeki önemini altını çizmektedir (6). GPR88'in aşırı ifadesi, Cresyl violet boyaması kullanılarak değerlendirilen hasar hacminde önemli bir

azalmaya yol açmıştır ($p=0.012$) (Şekil 6.4.1.A). Bu durum, GPR88'in uzun süreli iskemiyeye karşı bile nöroprotektif rol oynayabileceğini ve hasar hacmini sınırladığını göstermektedir. Apoptotik hücre sayısı, TUNEL boyama yöntemi ile analiz edilmiş ve GPR88'in aşırı ifadesinin apoptozu belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p=0.020$) (Şekil 6.7.1.A). Bu durum, GPR88'in apoptotik sinyal yollarını inhibe ederek hücre ölüm süreçlerini sınırladığını ve iskemi sonrası nöron kaybını azalttığını desteklemektedir. Nöronal sağ kalım, NeuN boyama yöntemi ile değerlendirilmiş ve GPR88'in aşırı ifadesinin nöronların korunmasını sağladığı ortaya konulmuştur ($p=0.035$) (Şekil 6.6.1.A). Bu bulgu, GPR88'in nöronlar üzerinde koruyucu bir etki sağlayarak iskemi sonrası beyin dokusunun bütünlüğünü desteklediğini göstermektedir. GPR88'in aşırı ifadesi, hasar hacmini azaltarak, apoptotik hücre ölümünü baskılayarak ve nöron sağ kalımını destekleyerek serebral iskemi sonrası nöroprotektif bir etki sağlamaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, araştırmacılar GPR88'in baskılanmasının striatumdaki hasar hacmi ve apoptotik hücre sayısı üzerindeki etkisini araştırmıştır (44). Bulgular, GPR88'in baskılandığı grupta hem hasar hacminde hem de apoptotik hücre sayısında artış olduğunu ortaya koyarak, bu reseptörün yokluğu ile nörolojik ve hücre hasarın şiddetlenmesi arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu düşündürmüştür. GPR88 baskılama grubunda, iskemiyeye maruz kalan striatum bölgesindeki hasar hacmi, kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte ($p>0.05$), dokusal değerlendirmeler GPR88'in baskılanmasının nöronal hasarı artıran bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 6.4.3.B). Ayrıca GPR88 baskılama grubunda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p=0.026$) (Şekil 6.7.1.B). Apoptotik hücre sayısındaki bu artış, GPR88'in anti-apoptotik mekanizmaları baskılayarak nöronal ölüm sürecini sınırladığını ve bu koruyucu mekanizmanın baskılanmasının hücre ölümü artırdığını göstermektedir. Ek olarak GPR88 baskılama grubunda, kontrol grubuna kıyasla NeuN pozitif nöron sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.014$) (Şekil 6.6.1.B). Bu bulgu, GPR88'in nöroprotektif etkisinin baskılanmasının, iskemi sonrası nöronların sağ kalımını azaltarak hücre hasarını artırdığını göstermektedir. Nöronal sağ kalım oranındaki

azalma ile apoptotik hücre sayısındaki artış arasında ters bir ilişki gözlenmiştir (Şekil 6.7.2). Bu durum, GPR88'in apoptotik hücre ölümünü baskılayarak nöron sağ kalımını destekleyen önemli bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, GPR88'in iskemi sonrası tedavi için güçlü bir hedef olabileceğini ve nöroprotektif mekanizmaların devreye sokulmasında kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Bu etkilerin, GPR88'in anti-apoptotik sinyal yolları ve hücrel koruma mekanizmalarını aktive etmesiyle sağlandığı düşünülmektedir. İleri çalışmalar, GPR88'in spesifik mekanizmalarının aydınlatılmasını ve potansiyel klinik uygulamalarının değerlendirilmesini sağlayabilir.

Serebral iskemi sürecinde kritik bir faktör, normalde kan ve beyin arasındaki maddelerin geçişi üzerinde sıkı bir kontrol sağlayan kan-beyin bariyerinin bozulmasıdır (52). Bu çalışmada, IgG boyama yöntemi kullanılarak GPR88'in KBB geçirgenliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. GPR88'in aşırı ifade grubunda KBB geçirgenliği anlamlı şekilde azalmış ve bu durum istatistiksel olarak desteklenmiştir ($p=0.002$) (Şekil 6.5.1.A). GPR88'in KBB bütünlüğünü koruması, bu toksik moleküllerin girişini engelleyerek nöronal sağ kalımı desteklemiştir (Şekil 6.6.1). GPR88 baskılaması, IgG pozitif alanların artışıyla birlikte KBB geçirgenliğinde bir artış eğilimi göstermiştir (Şekil 6.5.1.B). IgG boyama analizlerinde baskılama grubundaki KBB geçirgenliği artışı kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır ($p>0.05$). KBB geçirgenliği, endotel hücrelerinde oluşan apoptotik hücre ölümüne bağlı olarak artabilir. GPR88'in baskılanması, apoptotik süreçleri hızlandırarak KBB'nin yapısal hasarını artırmış olabilir (şekil 6.7.1.B). KBB geçirgenliğindeki bu eğilim, GPR88'in iskemi sonrası endotel hücre korumasında rol oynadığını ve bu proteinin eksikliğinin enflamasyon ve hücrel ölüm mekanizmalarını tetikleyerek bariyer hasarını artırabileceğini düşünmekteyiz.

8. SONUÇ

Beyne giden kan akışının azalmasıyla karakterize bir durum olan serebral iskemi, nöronal hasara ve beyin fonksiyonlarında bozulmaya yol açarak yıkıcı sonuçlar doğurabilir. İskeminin etkilerini hafifletmek için yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi çok önemlidir ve yetim G protein-bağlı reseptör GPR88 umut verici bir aday olarak ortaya çıkmıştır.

Son çalışmalar GPR88'in merkezi sinir sisteminde, özellikle de motor kontrol, bilişsel işlevler ve motivasyonel süreçler için çok önemli bir bölge olan striatumdaki önemli rolünü vurgulamıştır (4). GPR88 genindeki homozigot zararlı mutasyonlar, çocuklukta kore, öğrenme güçlüğü ve konuşma geriliği ile karakterize ailesel bir gelişim bozukluğuyla ilişkilendirilmiştir (4). Ayrıca, Gpr88 geninden yoksun fareler hiperlokomosyon, artan stereotipiler, motor koordinasyon ve öğrenme eksikliklerinin yanı sıra değişen anksiyete benzeri davranışlar sergilemektedir (4).

GPR88'in striatumdaki dağılımı ve düzenlenmesi kapsamlı araştırmalara konu olmuştur. Gelişmekte olan sıçan striatumundaki spatiotemporal ekspresyon analizi hem nigrostriatal hem de kortikostriatal yolakların GPR88'in düzenlenmesinde rol oynadığını ve çeşitli nörolojik süreçlerdeki potansiyel önemini göstermektedir (6).

Projemizde GPR88'in aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının akut dönem serebral iskemi üzerine etkileri araştırılmıştır. GPR88'in aşırı ekspresyonunun nöroprotektif etkiler sağladığı, nöronal hasarı azalttığı ve iskemik inme hayvan modellerinde fonksiyonel sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir. Tersine, GPR88'in baskılanması, nöronal hasarın şiddetlenmesi ve daha kötü iyileşme ile ilişkilendirilmiştir (4).

Bu bulgular, GPR88'in serebral iskemiye karşı hücrel ve moleküler tepkilerin modüle edilmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. GPR88 aşırı ekspresyonu ile gözlenen nöroprotektif etkiler, bu reseptörün iskemik inme ve ilgili nörolojik bozukluklar için terapötik bir hedef olma potansiyelini vurgulamaktadır.

GPR88'in nöroprotektif etkilerine aracılık ettiği spesifik mekanizmaları aydınlatmak ve potansiyel farmakolojik müdahaleler olarak seçici GPR88 agonistlerini geliştirmek ve değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



9. KAYNAKLAR

1. Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam T V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. Vol. 6, *Molecular Neurodegeneration*. 2011.
2. Chen B, Sun Y, Wei Z, Zhang Y. Long-term prognosis of patients with stroke associated with middle cerebral artery occlusion. Single-centre registration study. *Archives of Medical Science*. 2022;18:1199–207.
3. Flynn RWV, MacWalter RSM, Doney ASF. The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*. 2008 Sep;55:250–6.
4. Meirsmann AC, Ben Hamida S, Clarke E, de Kerchove d'Exaerde A, Darcq E, Kieffer BL. GPR88 in D1R-type and D2R-type medium spiny neurons differentially regulates affective and motor behavior. *eNeuro*. 2019 Jul;6.
5. Ye N, Li B, Mao Q, Wold EA, Tian S, Allen JA, et al. Orphan Receptor GPR88 as an Emerging Neurotherapeutic Target. Vol. 10, *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society; 2019. p. 190–200.
6. Massart R, Sokoloff P, Diaz J. Distribution and Regulation of the G Protein-Coupled Receptor Gpr88 in the Striatum: Relevance to Parkinson's Disease. In: *Mechanisms in Parkinson's Disease - Models and Treatments*. InTech; 2012.
7. Roth EJ. Ischemia. In: *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. Springer New York; 2011. p. 1359–60.
8. VN L, RV P, MI B, AV R, RA S. Study of capabilities of making detection device for cerebral ischemic state. *Med Res Innov*. 2018;2.
9. Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. Vol. 7, *International Journal of Stroke*. 2012. p. 378–85.
10. L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*. 2016;5.

11. Rennert RC, Wali AR, Steinberg JA, Santiago-Dieppa DR, Olson SE, Pannell JS, et al. Epidemiology, Natural History, and Clinical Presentation of Large Vessel Ischemic Stroke. *Clin Neurosurg*. 2019 Jul;85:S4–8.
12. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. Vol. 49, *Neuroradiology*. 2007. p. 93–102.
13. Fauzi A Al, Aji YK, Suroto NS. Neuroangiography patterns of the middle cerebral artery: Study of 554 cerebral angiography results. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2019 Oct;68:62–8.
14. Severson MA, Bell RS, Armonda RA. Triage and management of cranial injuries. Vol. 21, *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 2013. p. 105–15.
15. Sokolowski JD, Soldozy S, Sharifi KA, Norat P, Kearns KN, Liu L, et al. Preclinical models of middle cerebral artery occlusion: new imaging approaches to a classic technique. Vol. 14, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media SA; 2023.
16. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. Vol. 80, *Neuron*. 2013. p. 844–66.
17. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: Pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. Vol. 47, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2013. p. 9–23.
18. Vidale S, Longoni M, Valvassori L, Agostoni E. Mechanical thrombectomy in strokes with large-vessel occlusion beyond 6 hours: A pooled analysis of randomized trials. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*. 2018 Jul;14:407–12.
19. Heiss WD. The ischemic penumbra: How does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1268:26–34.

20. Leiva-Salinas C, Wintermark M. Imaging of acute ischemic stroke. Vol. 20, Neuroimaging Clinics of North America. 2010. p. 455–68.
21. Guo Y, Li P, Guo Q, Shang K, Yan D, Du S, et al. Pathophysiology and biomarkers in acute ischemic stroke - A review. Vol. 12, Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2013. p. 1097–105.
22. Rami A, Krieglstein J. Brain damage caused by ischemia: Pathophysiological and pharmacological aspects. *Dementia*. 1993;4:21–31.
23. Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. Vol. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2022.
24. Salmeron KE, Edwards DN, Fraser JF, Bix GJ. Edema and BBB Breakdown in Stroke. In: Brain Edema: From Molecular Mechanisms to Clinical Practice. Elsevier; 2017. p. 219–33.
25. Gauberti M, Montagne A, Quenault A, Vivien D. Molecular magnetic resonance imaging of brain-immune interactions. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov;8.
26. Uchida Y, Kan H, Sakurai K, Oishi K, Matsukawa N. Contributions of blood-brain barrier imaging to neurovascular unit pathophysiology of Alzheimer's disease and related dementias. Vol. 15, Frontiers in Aging Neuroscience. Frontiers Media S.A.; 2023.
27. Hu X, Michael De Silva T, Chen J, Faraci FM. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. Vol. 120, Circulation Research. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 449–71.
28. Mizuma A, Yenari MA. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke. Vol. 8, Frontiers in Neurology. Frontiers Media S.A.; 2017.

29. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: Experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 1999;138.
30. O'Reilly MK, Mogensen MA. Artery of Percheron Stroke: Imaging and Clinical Findings. *PM and R.* 2019 Oct;11:1135–8.
31. Moulin DE, Lo R, Chiang J, Barnett H. Prognosis in middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1985;16:282–4.
32. M. M, Martins C, da Silva JC, Flix Mendona CM, B. P, P.A. L. An Innovative Technique of Decompressive Craniectomy for Acute Ischemic Stroke. In: *Advances in the Treatment of Ischemic Stroke.* InTech; 2012.
33. Tong Y, Lee H, Kohls W, Han Z, Duan H, Cheng Z, et al. Remote ischemic conditioning (RIC) with exercise (RICE) is safe and feasible for acute ischemic stroke (AIS) patients. *Front Neurol.* 2022 Nov;13.
34. Maruyama K, Kashiwazaki D, Yamamoto S, Akioka N, Hori E, Kuroda S. Coil embolization for post-bypass aneurysm of middle meningeal artery for moyamoya disease – preservation of transdural anastomosis. *Surg Neurol Int.* 2023;14.
35. Jung JE, Kim GS, Chen H, Maier CM, Narasimhan P, Song YS, et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: From basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. In: *Molecular Neurobiology.* Humana Press; 2010. p. 172–9.
36. Kaur G, Verma SK, Singh D, Singh NK. Role of G-Proteins and GPCRs in Cardiovascular Pathologies. Vol. 10, *Bioengineering.* MDPI; 2023.
37. Dreuw A, Radtke S, Pflanz S, Lippok BE, Heinrich PC, Hermanns HM. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Aug;279:36112–20.
38. Dreuw A, Radtke S, Pflanz S, Lippok BE, Heinrich PC, Hermanns HM. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Aug;279:36112–20.

39. Bartuzi D, Kaczor AA, Targowska-Duda KM, Matosiuk D. Recent advances and applications of molecular docking to G protein-coupled receptors. Vol. 22, *Molecules*. MDPI AG; 2017.
40. Waes V Van, Tseng KY, Steiner H. GPR88: A putative signaling molecule predominantly expressed in the striatum: Cellular localization and developmental regulation. *Basal Ganglia*. 2011 Jul;1:83–9.
41. Schroers A, Hecht O, Kallen K, Pachta M, Rose-John S, Grötzinger J. Dynamics of the gp130 cytokine complex: A model for assembly on the cellular membrane. *Protein Science*. 2005 Mar;14:783–90.
42. Massart R, Mignon V, Stanic J, Munoz-Tello P, Becker JAJ, Kieffer BL, et al. Developmental and adult expression patterns of the G-protein-coupled receptor GPR88 in the rat: Establishment of a dual nuclear–cytoplasmic localization. *Journal of Comparative Neurology*. 2016 Oct;524:2776–802.
43. Logue SF, Grauer SM, Paulsen J, Graf R, Taylor N, Sung MA, et al. The orphan GPCR, GPR88, modulates function of the striatal dopamine system: A possible therapeutic target for psychiatric disorders? *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2009 Nov;42:438–47.
44. Quintana A, Sanz E, Wang W, Storey GP, Güler AD, Wanat MJ, et al. Lack of GPR88 enhances medium spiny neuron activity and alters motor- and cue-dependent behaviors. *Nat Neurosci*. 2012 Nov;15:1547–55.
45. Komatsu H. Novel therapeutic GPCRS for psychiatric disorders. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun;16:14109–21.
46. Galet B, Ingallinesi M, Pegon J, Do Thi A, Ravassard P, Faucon Biguet N, et al. G-protein coupled receptor 88 knockdown in the associative striatum reduces psychiatric symptoms in a translational male rat model of Parkinson disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2021;46:E44–55.

47. Beker MC, Pence ME, Yagmur S, Caglayan B, Caglayan A, Kilic U, et al. Phosphodiesterase 10A deactivation induces long-term neurological recovery, 1cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2022 Dec;358.
48. Tabachnick BG, Fidell LS, Ullman JB. *Using multivariate statistics*. Vol. 6. pearson Boston, MA; 2013.
49. Ingallinesi M, Galet B, Pegon J, Biguet NF, Thi A Do, Millan MJ, et al. Knock-down of GPR88 in the dorsal striatum alters the response of medium spiny neurons to the loss of dopamine input and L-3-4-dyhydroxyphenylalanine. *Front Pharmacol*. 2019;10.
50. Singer O, Verma I. Applications of Lentiviral Vectors for shRNA Delivery and Transgenesis. *Curr Gene Ther*. 2008 Dec;8:483–8.
51. Suzuki H, Zhang JH. Neurobehavioral Assessments of Subarachnoid Hemorrhage. In 2012. p. 435–40.
52. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. Vol. 16, *Neurobiology of Disease*. 2004. p. 1–13.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü |
|-----------------|----------|------|--------------------------|
| 26/01/2021 | 07 | | Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ |

"GPR88'in Akut Beyin Hasarı Sonrası Rolünün İncelenmesi." başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

| GÖREVİ | ADI SOYADI | İMZA |
|--------|-------------------------------------|------|
| Başkan | Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ | |
| Üye | Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI | |
| Üye | Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR | |
| Üye | Cem GÜNEŞ | |
| Üye | Burak Sefa DERİBAŞ | |