



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MER TİROZİN KİNAZ'IN YENİDOĞAN HİPOKSİ İSKEMİ  
MODELİNDE AKUT DÖNEM ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BUSE BALABAN

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2023

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji  
Tez Sahibi : Buse Balaban  
Tez Başlığı : Mer Tirozin Kinaz'ın Yenidoğan Hipoksi İskemi Modelinde Akut Dönem Etkilerinin Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi :

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

### Danışman

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

### Kurumu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar BEKER

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nilay ATEŞ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans 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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

BUSE BALABAN

# İTHAF



*“Bu tez  
aileme ithaf edilmiştir...”*

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana tecrübeleriyle yol gösteren ve destekleyen danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en derin minnettarlığımı sunarım.

Bu araştırmanın tasarım, deney ve tez aşamalarında bana yol gösteren ve başından sonuna kadar rehberlik eden Dr. Öğr. Üye. Mustafa Çağlar BEKER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz desteği ve değerli tavsiyelerinin yanı sıra, bir hocadan çok abla olan Dr.Öğr. Üye. Pelin DİLSİZ ERİM'e en derin minnettarlığımı sunarım.

Berber bu yola başlayarak tüm zorlukları birlikte aştığımız, hem ekip arkadaşım hem de canım dostum Ayşenur ÖZPINAR'a eşsiz desteği için çok teşekkür ederim.

Değerli bilgisini, deneyimlerini aktaran ve laboratuvarında el becerimin gelişmesinde büyük katkısı olan Dr. Serdar ALTUNAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar içerisinde zorlukların üzerinden birlikte geldiğimiz değerli arkadaşlarım Halil İbrahim KOÇ'a, Sevban BAYIRLI'ya Çiğdem BAYRAKTAROĞLU'na, Zehra DEĞİRMENCİ'ye, Oğuzhan BAYGÜL'e, Enes DOĞAN'a, Nursena ŞENGÜN'e, Dr. İrem ÇULHA TAŞKIN'a, Dr. Zeynep BALÇIKANLI'ya, Dr. Saltuk Buğra BALTACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bana büyük bir şans tanıyarak bu yola başladığım ve yıllardır her konuda yanımda olan Dr. Safa AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tükenmeyen sabrı ve sonsuz desteği için Murad ALİ'ye en derin minnettarlığımı sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca bana sundukları sarsılmaz destek ve sonsuz sevgileri için sevgili annem Dilek BALABAN, babam Ali BALABAN ve abim Can Berk BALABAN'a en içten duygularıyla minnettarlığımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY FORMU</b> .....	<b>i</b>
<b>ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI</b> .....	<b>ii</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>10</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>12</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>14</b>
4.1. Yenidoğan hipoksi iskemisi .....	14
4.1.1. Enerji metabolizması .....	15
4.1.2. Glutamat eksitotoksitesi ve oksidatif stres .....	17
4.1.3. Apoptotik süreçler .....	19
4.1.4. İnflamasyon ve sitokin salınımı .....	20
4.2. TAM reseptör ailesi.....	21
4.2.1. TAM reseptörlerinin yapısı, ligandları ve ekspresyon profilleri .....	22
4.2.2. MerTK fonksiyonları ve etkili olduğu sinyal yolları.....	23
<b>5. MATERYAL METOT</b> .....	<b>25</b>
5.1. Deney planı ve deney grupları .....	25
5.2. Deney hayvanı çalışmaları .....	26
5.2.1. Yenidoğan hipoksi iskemi modeli.....	26
5.3. İnhibitör uygulaması .....	28
5.4. Cryostat cihazı kullanılarak beyinlerin kesilmesi .....	29
5.5. Cresyl violet boyaması .....	29
5.6. NeuN boyaması .....	30
5.7. TUNEL boyaması .....	30

5.8. Sitokin ve kemokin profili.....	31
5.9. İstatistiksel analizler.....	32
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
6.1. Beyin hacmi, atrofi ve hasar alanı analizi.....	33
6.2. Nöronal sağkalım analizi.....	36
6.3. DNA fragmantasyon analizi.....	38
6.4. Sitokin ve kemokin analizleri.....	40
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>55</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>56</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>63</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>64</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
<b>EAA</b>	Uyarıcı amino asitler
<b>FNIII</b>	Fibronektin-tipIII
<b>GLUT</b>	Glukoz taşıyıcı proteinleri
<b>HI</b>	Hypoxic ischemia
<b>Hİ</b>	Hipoksik iskemisi
<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir NOS
<b>KBB</b>	Kan beyin bariyeri
<b>KO</b>	Knockout
<b>MCT</b>	Monokarboksilik asit taşıyıcı proteinleri
<b>MerTK</b>	Mer Tirozin Kinaz
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>NHI</b>	Neonatal hypoxic ischemia
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RTK</b>	Reseptör tirozin kinaz
<b>Tyro3</b>	Tirozin kinaz reseptörü 3
<b>WT</b>	Yabanıl Tür
<b>YHI</b>	Yenidoğan hipoksik iskemisi
<b>YSLE</b>	Yetişkin sistemik lupus eritematozus

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1.1. Beyindeki enerji metabolizmasının KBB, astrosit ve nöronlar arası döngüsü .....	16
Şekil 4.1.2.1. Hİ sonucu oluşan beyin hasarındaki NMDA aktivasyonu kaynaklı sinyal yolları .....	18
Şekil 5.1.1. Çalışmanın genel planı .....	26
Şekil 5.2.1.2. Yenidoğan hipoksi iskemi operasyon ünitesi ve P7 hipoksi kammon karotid arter iskemi yöntemi .....	27
Şekil 5.2.1.3. %9 O <sub>2</sub> ve %91 N <sub>2</sub> olan yenidoğan hipoksi çemberi ünitesi .....	28
Şekil 5.5.1. Cresyl Violet boyalı kesit görüntüsü .....	29
Şekil 5.6.1. NeuN boyaması yapılmış kesitin taramalı konfokal mikroskop görüntüsü .....	30
Şekil 5.7.1. TUNEL boyanan kesitin konfokal mikroskop görüntüsü.....	31
Şekil 5.8.1. Deney gruplarında sitokin ve kemokin analiz görüntüsü .....	32
Şekil 6.1.1. Beyin hacmi analizi .....	33
Şekil 6.1.2. Beyin atrofi analizi .....	34
Şekil 6.1.3. Beyin hasar hacmi analizi .....	34
Şekil 6.1.4. Beyin striatum hacmi analizi .....	35
Şekil 6.1.5. Beyin korpus kallozum hacmi analizi .....	35
Şekil 6.1.6. Beyin hipokampus hacmi analizi.....	36
Şekil 6.2.1. Sham gruplarındaki nöronal sağkalım analizi .....	37
Şekil 6.2.2. Doğaltür gruplarındaki nöronal sağkalım analizi .....	37

<b>Şekil 6.2.3.</b> Knockout gruplarındaki nöronal sağkalım analizi.....	38
<b>Şekil 6.3.1.</b> Doğaltür gruplarındaki DNA fragmantasyon analizi .....	39
<b>Şekil 6.3.2.</b> Knockout gruplarındaki DNA fragmantasyon analizi.....	39
<b>Şekil 6.4.1.</b> BLC, C5/C5a, Eotaxin ve G-CSF sitokinlerinin analizi.....	40
<b>Şekil 6.4.2.</b> GM-CSF, ICAM-1, IP-10 ve I-TAC sitokinlerinin analizi .....	41
<b>Şekil 6.4.3.</b> I-309, INF- $\gamma$ , JE ve KC sitokinlerinin analizi.....	42
<b>Şekil 6.4.4.</b> M-CSF, MCP-5, MIG ve MIP1 $\alpha$ sitokinlerinin analizi.....	43
<b>Şekil 6.4.5.</b> TARC, TIMP-1, TNF $\alpha$ ve TREM-1 sitokinlerinin analizi.....	45
<b>Şekil 6.4.6.</b> MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES ve SDF-1 sitokinlerinin analizi .....	46
<b>Şekil 6.4.7.</b> IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra ve IL-2 sitokinlerinin analizi.....	47
<b>Şekil 6.4.8.</b> IL-3, IL-4, IL-5 ve IL-6 sitokinlerinin analizi .....	48
<b>Şekil 6.4.9.</b> IL-7, IL-10, IL-12p70 ve IL-13 sitokinlerinin analizi .....	52
<b>Şekil 6.4.10.</b> IL-16, IL-17, IL-23 ve IL-27 sitokinlerinin analizi .....	54

## 1. ÖZET

### MER TİROZİN KİNAZ'IN YENİDOĞAN HİPOKSİ İSKEMİ MODELİNDE AKUT DÖNEM ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yenidoğan hipoksik iskemisi (YHİ), perinatal dönemde morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerindendir. Maruz kalınan oksijen eksikliğine bağlı olarak ölümden mental ve motor rahatsızlıklara kadar kalıcı hasara neden olabilmektedir. Hipoksik iskeminin (Hİ) patofizyolojik süreçleri oksijensiz kalan dokuda inflamasyon, nöronal eksitotoksisite, hücrel apoptoz ve mikroglial aktivasyon olduğu görülmektedir. Bu patofizyolojik süreçlerin anlaşılması ve engellenmesine yönelik çalışmalar, uzun dönemde meydana gelebilecek geri döndürülemez sonuçların da önüne geçilmesini sağlayabilecek niteliktedir.

MerTK'nın beyin hasarı sonrası özellikle subakut dönemde ifadesinin artması bize MerTK'nın dejeneratif süreçlerin yanında YHİ sonrası beyin oluşum koşullarına yeniden modellenmesinde kritik bir rolü olduğunu düşündürmektedir. MerTK'nın bu süreçlere etkisinin araştırılması amacıyla MerTK *knockout* farelerin yanında olası genetik değişikliklerin sonuçlara olan etkilerinin en aza indirgenmesi için spesifik MerTK inhibitörü UNC2025'de kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında MerTK inhibisyonunun; hasar hacmi, nöronal sağkalım ve DNA fragmentasyonunda doğrudan bir etkisi olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, MerTK inhibisyonunun efferositoz ve pro-inflamatuvar sitokin salınımıyla apoptotik hücrelerin sayısını arttırdığı düşünülmektedir. Veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, MerTK'nın YHİ patofizyolojisindeki fonksiyonunun tam olarak anlaşılabilmesi amacıyla daha detaylı moleküler çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** MerTK, UNC2025, Yenidoğan hipoksi iskemisi,

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 1001 proje kapsamında 121S601 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF MER TYROSINE KINASE ON ACUTE INJURY PROGRESS AFTER NEONATAL HYPOXIA ISCHEMIA**

Neonatal hypoxic ischemia (NHI) is one of the most important causes of morbidity and mortality in perinatal period. It causes permanent damage from death to mental and motor disorders depending on the oxygen deficiency being exposed to. Pathophysiological processes of hypoxic ischemia (HI) include inflammation, neuronal excitotoxicity, cellular apoptosis, and microglial activation in the tissue. Studies aimed understanding and preventing pathophysiological processes that have been capable of preventing irreversible consequences which may occur in chronic period. Albeit no effective treatment against NHI has been opposed so far.

The increase in the expression of MerTK after brain injury, especially in the subacute period, demonstrated that MerTK plays a critical role in remodeling the conditions that occur after NHI, as well as the degenerative processes. In order to study the effect of MerTK on these mechanisms, MerTK knockout mice were used along with the specific MerTK inhibitor. This thesis suggests that MerTK inhibition has a direct effect on the volume of injury, neuronal survival, and DNA fragmentation. In addition, MerTK inhibition is thought to increase the number of apoptotic cells through efferocytosis and pro-inflammatory cytokine release. Taken together, the data suggest that more detailed molecular studies are needed to fully understand the function of MerTK in the pathophysiology of NHI.

**Keywords:** MerTK, UNC2025, Newborn hypoxic ischemia

This thesis was supported by the TUBITAK project No: 121S601 within the scope of the 1001 project.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğan hipoksi-iskemisi (YHI), oksijen yoksunluğundan kaynaklanan beyin hasarıdır ve uzun süreli sekeller ve sosyo-ekonomik yükler bakımından önde gelen pediatrik nörolojik koşullardan birisidir. Yapılan istatistiklere göre hipoksi iskemi insidansının değişmekte olduğu ve her 1000 canlı doğumdan 4'e kadar ulaştığını göstermektedir ve bu oran yılda yaklaşık dört milyon çocukta bu durumun görülebileceğini göstermektedir [1, 2] Oksijensiz kalmış yenidoğanların neredeyse %20-50'si yenidoğan döneminde ölmekte ve hayatta kalanlarda ise ciddi sağlık sonuçları ve kalıcı hasarlar görülmektedir [2]. Yenidoğanın çeşitli fizyolojik telafi edici mekanizmalara sahip olmasına rağmen, kalıcı bir hipoksi nörolojik bozukluk durumuna yol açabilmektedir.

Nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar süreçlerde TAM'ların rolüne dair kanıtlar hızla artmaktadır. TAM reseptörleri negatif mediyatör gibi davranarak aşırı proinflamatuvar sitokin salgılanmasının önüne geçmektedir. Ayrıca TAM agonisti Gas6'nın anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinmektedir [3]. Ancak Gas6 TAM reseptör ailesinin temel agonisti olduğundan Gas6 aktivasyonu ile bütün bir TAM ailesi aktive olmaktadır ve gelişmekte olan beyine özellikle hasar sonrasında ne gibi etkilerinin olacağı bilinmemektedir. Bununla beraber, TAM reseptörleri normal yaşam sürecinde nöral kök hücre canlılığını, proliferasyonunu ve nöronal farklılaşmaya yardımcı olduğu bilinmektedir [4].

TAM ailesinin her üyesinin beyin hücrelerindeki ifade edilme düzeyleri de birbirlerinden farklıdır. TAM reseptörlerinden olan Mer Tirozin Kinaz (MerTK) en yüksek seviyede astrositlerde ifade edilir ve apoptotik hücrelerin fagositozu, inflamasyon ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde işlevleri olduğu bilinmektedir. İnflamasyon, beyin hasarı sonrası oluşan patofizyolojik süreçlerin en önemlilerinden olup anti-enflamatuvar ajanların veya immunosupressantların hasarı anlamlı derecede azalttığı bilinmektedir. MerTK fizyolojik ve patolojik koşullarda hücre sağkalımı ve homeostazisinde hücre göçü, fagositozu, metabolik ürünlerin ortadan kaldırılması gibi önemli görevler aldığı düşünülmektedir. MerTK'nın her ne

kadar beyinde apoptotik hücrelerin fagosite edilmesinde görev aldığı bilinse de YHİ sonrasındaki patofizyolojik süreçler ile ilgili bilinenler yeterli değildir. MerTK inhibitörleri geliştirilmekte olup bu inhibitörler ile MerTK'nın etkilerini anlamaya yönelik literatürdeki çalışmaların büyük bir kısmı kanser üzerine olduğu görülmektedir ve nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Beyin hasarı sonrası subakut dönemde MerTK'nın dokulardaki ifadesi artmaktadır. Buna bağlı olarak, MerTK'nın nörodejeneratif süreçlerde ve beyin plastisitesinde kritik bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu tez kapsamında, MerTK inhibisyonunun akut yenidoğan hipoksik iskemisindeki fonksiyonunun araştırılması hedeflenmiştir. Hasar hacmi, atrofi, nöronal sağkalım, DNA fragmentasyonu analizleri ile iskemik hasarın derecesi, sitokin ve kemokin profillerinin analizi ile ise inflamatuvar süreçlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Yenidoğan hipoksi iskemisi

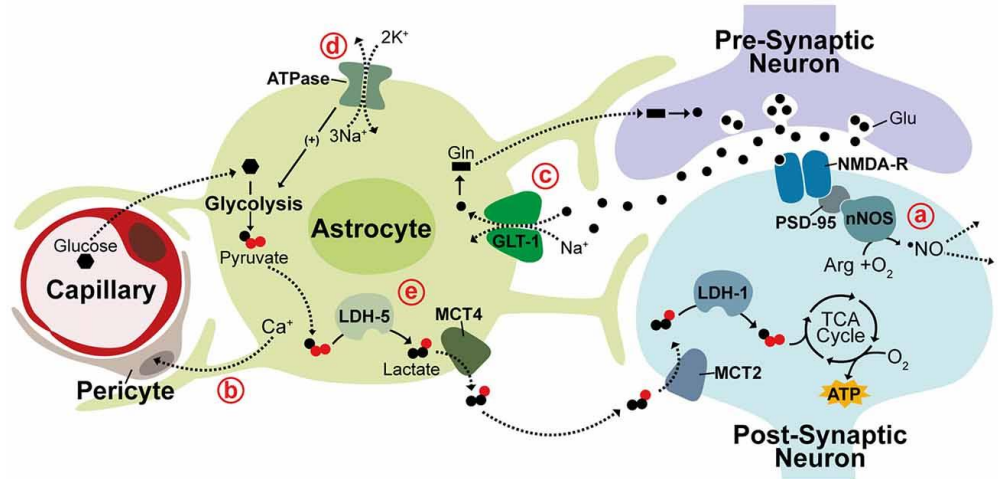
İnsan beyni, iskelet kası veya kalp gibi mekanik işler yapmamasına rağmen vücuttaki metabolik olarak en aktif organlardan biridir. Beyin dokusunun yüksek oksijen tüketim hızı göz önüne alındığında, oksidatif metabolizmanın devamlılığı için kan yoluyla kesintisiz bir substrat kaynağına bağımlıdır [5]. Oksijenin neredeyse tamamı beyinde karbonhidratların oksidasyonunu sağlamak amacıyla kullanılır [6]. Glikoz, beyin birincil metabolik substratıdır ve oksidatif metabolizmayı sürdürmek için gerekli glikoz ve oksijen depoları olmadan, homeostatik beyin fonksiyonu hızla kaybolur. Bu nedenle diğer organlara kıyasla beyin dokusundaki dolaşım bozuklukları patolojik sonuçlarını şiddetlendirmektedir [5].

Yenidoğan hipoksi-iskemisi (YHI), doğumda veya sonrasında beyin dokusuna yeterli oksijen ve kan akışı sağlanamamasına bağlı nörolojik bir durumdur [7]. YHI'nin sebepleri tam olarak bilinmese de oksijen ve besin bakımından plasentanın yetersiz kalması, doğumda oluşabilecek dolaşım problemleri, doğum sonrasındaki kalp ve solunum problemlerinin yol açtığı düşünülmektedir. 2015 yılında yapılan bir çalışmaya göre, gelişmiş ülkelerde YHI görülme sıklığı 1000 doğumda 1 ila 8 arasında değişirken, az gelişmiş ülkelerde 1000 canlı doğumda 26'ya kadar çıkmaktadır [8]. Neonatal HI'dan kurtulan hastaların %5-10'unda kalıcı motor bozukluklar ve %20-50'sinde ergenliğe kadar devam eden duyuşsal veya bilişsel anormallikler görülür [9]. Hayatta kalanlarda, beyin hasarı sebebiyle uzun vadede epilepsi, serebral palsi, Alzheimer's, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır [10, 11]. Yoğun bakım ve solunum desteği teknolojilerinin ilerlemesine bağılı olarak yenidoğanların hayatta kalma oranı artmış olsa da popülasyonda artan bir engellilik yükü oluşturmuştur. Buna rağmen, mevcut olan önleyici veya koruyucu tedaviler çok az sayıda ve yetersizdir. Kompleks patofizyolojisi ve geniş semptom spektrumu sebebiyle klinikte hastalığın tespiti zorlaşmaktadır. YHI sırasında ve sonrasında kullanılmak amacıyla yeni nöroprotektif tedaviler geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Hipoksik-iskemik beyin hasarı mekanizmalarının yanı sıra olası terapötik müdahalelere dair güncel bilgilerimizin büyük bir kısmı, yetişkinlerde deneysel inme modellerine ilişkin kapsamlı bir literatürden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, doku enerji rezervlerini tüketmeye yetecek şiddette bir serebral hipoksik-iskemik olayı hızla asidoz, glutamat eksitotoksitesisi, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve oksidatif stresin takip ettiği, bunu da uzun süreli gecikmiş hücre ölümü veya apoptoz ve inflamasyonun izlediği artık iyi bilinmektedir [12]. Fakat yetişkin beyninde elde edilen verilerin yeni doğan hayvanlara uygulanması bir çelişki dolayısıyla engellenmiştir. Olgunlaşmamış beyin çoğunlukla YHI'nin zararlı etkilerine karşı 'dirençli' olarak kabul edilirken, aynı zamanda beynin spesifik gelişim aşamasına bağlı olarak yaralanmaya karşı hassasiyet dönemleri de sergilemektedir. Dahası, gelişmekte olan beyne yönelik hipoksik veya hipoksik-iskemik bir etki, sonraki olgunlaşmayı etkileyerek yetişkin beyni için uzun süreli sonuçlar doğuracaktır.

#### **4.1.1. Enerji metabolizması**

Beyin, glikoz metabolizması açısından şaşırtıcı derecede aktif bir dokudur; hayati fonksiyonlarını sürdürmek için sağlanan enerjinin neredeyse tamamı glikoz oksidasyonundan elde edilir [13]. Ancak olgunlaşmamış beyindeki serebral glikoz metabolizmasının, HI sırasında enerji yetersizliğine karşı hem direnç hem de hassasiyet oluşturacak şekilde yetişkinlerden farklı olduğu bilinmektedir [2]. Ayrıca, yetersiz glikoz varlığı veya artan enerji ihtiyacı gibi durumlardan elde edilen bulgular, beynin yakıt seçeneklerinde statik olmadığını göstermiştir [14]. Beyin, enerji ihtiyaçlarını gidermek amacıyla glukoz harici laktatı ve keton gövdelerini,  $\beta$ -hidroksibutirat veya asetoasetatı, kolaylıkla kullanabilir [2].



**Şekil 4.1.1.1.** Beyindeki enerji metabolizmasının KBB, astrosit ve nöronlar arası döngüsü [15].

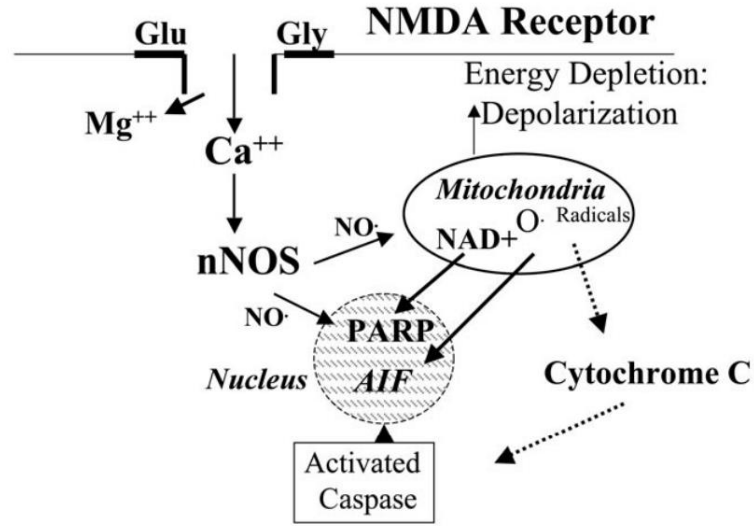
Bu substratların dolaşımından beyne taşınmasına iki integral membran proteini ailesi aracılık eder: kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcı proteinleri (GLUT) ve protona bağlı monokarboksilik asit taşıyıcı proteinleri (MCT) [16, 17]. Bu ailelerin memeli beyinde başlıca belirlenmiş olan izoformları GLUT1 ve GLUT3 ile MCT1 ve MCT2'dir. GLUT1 birincil olarak glikozun kan-beyin bariyeri boyunca taşınmasından sorumludur ve GLUT3 glikozun nöron içine alımını kontrol eder [18]. Serebral glukoz tüketimi doğum sonrası ilk haftalarda yetişkin değerinin yalnızca onda biri kadardır ve GLUT seviyeleri de benzer şekilde düşüktür [2]. Ancak, keton cisimleri ilk 2 hafta süresince serebral metabolik ihtiyacın önemli bir bölümünü sağlar. Ayrıca MCT1 ifadesi kan beyin bariyerinde (KBB) çok yüksek olup neredeyse tüm hücre tiplerinde, astrosit, nöron ve glialarda, eksprese edilirken MCT2 ifadesi nöronlarla sınırlandırılmıştır [19]. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, kemirgen sütünün yüksek keton içeriği sebebiyle postnatal dönemde ilk iki haftada emziren kemirgenlerin keton gövdesi kullanımının maksimuma ulaştığını ve serebral mikrodamarlardaki MCT1 ekspresyonu da arttığını göstermektedir [20]. Böylelikle, sadece keton gövdelerinin beyne taşınması kolaylaştırılmakla kalmayıp, laktik asidin alımına ve uzaklaştırılmasına da katkıda bulunabilir. Beynin olgunlaşarak ana oksidatif kaynak olarak glukozu geçişi, KBB'deki MCT1, GLUT1 ve özellikle nöronal GLUT3 seviyesinin azalarak yetişkin düzeyine ulaşmasını sağlar [21].

Dolayısıyla yenidoğan beyni, düşük glukoz taşıma kapasitesi ve hem keton gövdesi hem de laktat taşıma için yüksek kapasite ile karakterize edilir.

Beynin gelişimsel süreçlerinde hem GLUT hem MCT ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenir. HI süresince, beyin glukoz kullanımı yüksek seviyere ulaştığı için glukozla olan bağımlılığı da artar [21]. Yapılan çalışmalar, P7 sıçan beyinde glukoz taşıyıcılarının düşük konsantrasyonda olması, gelişimin bu safhasında serebral glukoz kullanımını sınırlı kılmaktadır [22]. HI sırasında beyin glukoz konsantrasyonlarının büyük ölçüde azalması yenidoğanların hasar sonrası hayatta kalma yeteneğini arttığını düşündürmektedir. Yetişkin beyinde ise bu durum ters bir etki yaparak doku hasarının şiddetlenmesine sebep olur [19].

#### **4.1.2. Glutamat eksitotoksitesi ve oksidatif stres**

Uyarıcı amino asitler (EAA), glutamat ve aspartat, memeli beyinde gerçekleşen hızlı sinaptik iletimin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Normal şartlar altında glutamat presinaptik sinir terminallerinde, nöronal depolarizasyon ile salınımı uyarılana kadar tutulur [23]. Sinaptik boşluğa salındıktan sonra nörotransmitterler, sinapsları ve sinir terminallerini saran astrositlerdeki glutamat reseptörleri tarafından hızlıca alınarak geri kazanım için sinir terminaline gönderilmeden önce glutamine dönüştürülür [24]. HI'ye bağlı olarak hücreler enerji depolarının tüketilmesi, nöron ve glia depolarizasyonuna ve merkezi sinir sistemine aşırı miktarda uygulandığında eksitotoksiteye sebep olduğu bilinen EAA'lerin hücre dışı alana salınmasına yol açar [25]. EAA'lar, gri ve beyaz cevherin hassas alanlarındaki nöronlar ve astrositler üzerinde ifade edilen iyonotropik N-metil-D-aspartat (NMDA) ve  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit (AMPA) reseptörlerini aktive eder [26]. EAA reseptörlerinin ekspresyonu olgunlaşmamış beyinde yüksek olup, gelişim sürecinde kritik görevlere sahiptir. Yenidoğan beyni, yetişkin beynine göre NMDA reseptör aracılı eksitotoksiteye duyarlılığı yüksektir [27].



**Şekil 4.1.2.1.** Hİ sonucu oluşan beyin hasarındaki NMDA aktivasyonu kaynaklı sinyal yolları [28].

Eksitotoksisite sonucu aşırı aktifleşen NMDA reseptörleri ve kalsiyum geçirgen AMPA reseptör kanalları, nöronların hücre içi depolardan aşırı kalsiyum salınımını stimüle eder [29]. Bu durum, kalpain aktivasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) sentezi, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) indüklenmesi ve mitokondriyel disfonksiyon gibi aşağı yönlü sinyal yollarını başlatarak hücre nekrozu veya apoptozu ile sonuçlanır [30, 31].

Yapılan araştırmalar, caplain'in kalsiyum aracılığıyla etkinleştirilmesinin, normal şartlarda düşük hücre içi kalsiyum seviyelerini koruyan membran NCX Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> değiştiricisini tahrip ederek de bu sürece katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır [32]. Olgunlaşmamış beyinde nNOS ve indüklenebilir NOS (iNOS) seviyeleri yetişkin beyine göre daha yüksektir. Artan nitrik oksit (NO) düzeyleri hem pozitif hem de negatif olarak modülasyona açıktır [33]. NO'nun süperoksit ile reaksiyonu lipid peroksidasyonunu arttırırken, radikal ara maddelerin bazılarını temizleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe ederek yağ asidi zincir yayılma reaksiyonlarını durdurabilir [34, 35]. Buna ek olarak, nNOS'un kalsiyum yoluyla etkinleştirilmesi ve aşırı kalsiyum yüklenmesi mitokondrinin işlevsiz kalmasına ve ROS üretimine yol açmaktadır [36]. Mitokondriden serbest bırakılan sitokrom C ve Fas aktivasyonu da kaspazların etkinleştirilmesine neden olarak apoptozu zemin hazırlar [37].

### 4.1.3. Apoptotik süreçler

Hücre ölümü biyokimyasal ve morfolojik ölçütlere dayanarak apoptotik veya nekrotik olarak sınıflandırılır [38]. Nekrotik ölüm genellikle ciddi bir hasar sonucu meydana gelir ve membran bütünlüğünde bozulma, sitoplazmik içeriğin hücre dışı boşluğa yayılması ve sekonder bir enflamatuar yanıt ile nitelendirilir [39]. Apoptoz ise hücrenin kendini imha ettiği, oldukça düzenlenmiş ve enerji gereksinimi olan bir süreçtir [38]. Nükleer kondansasyon ve kontraksiyon başlangıçta gerçekleşirken, membranlar ve organeller son evrelere gelinceye kadar intakt kalırlar. Hücresel kalıntılar apoptotik gövdeler olarak tomurcuklanarak çevre hücreler tarafından alınır [39, 40]. Fakat birçok bulgu Hİ sonucu gelişen apoptozun morfolojik olarak gelişimsel apoptozdan farklı şekilde gerçekleştiğini ve melez nekrotik-apoptotik fenotiplerin meydana geldiğini göstermektedir [41]. Aksine, biyokimyasal açıdan, yapılan araştırmaların birçoğu Hİ'de apoptotik süreçlerin devreye girdiği konusunda hemfikirdir [2]. Yetişkin beynine kıyasla yenidoğan beyinde kaspaz-3, APAF-1, Bcl-2 ve Bax gibi apoptozun temel elemanları daha fazla düzenlenir ve patolojik durumlarda da önemli bir role sahiptir [42, 43]. Çoğu memeli hücresinde apoptoz, Kaspaz-3, -6 veya -7'nin aşağı yönde aktivasyonuna öncülük eden bir sistemin proteaz ailesi olan kaspazları içerir. Kaspaz-3, MSS'de temel yürütücü gibi görünmektedir ve aktivasyonu, hücrenin yaşamsal faaliyetlerini devamlılığı için elzem olan çoğu substratın hücre içinde degradasyonuna yol açar [44]. Kaspaz-3 hem intrinsik hem de ekstrinsik (reseptör aracılı) yollarla aktive edilebilir. İntrinsik mekanizma sitokrom C salınımını ve 'apoptozom' formasyonu sonucunda kaspaz-9 aktivasyonunu kapsar. Ekstrinsik mekanizma ise Fas-ligandının reseptörüne bağlanarak kaspaz-8'in bölünmesine ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açmasıdır [45]. Kaspaz sistemlerinin Hİ'ye yanıt olarak gelişmekte olan beyinde devreye girdiğine dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitelerinin tamamı artmakta ve aşağı yönlü substratları olan ICAD ve poli(ADP-riboz)polimeraz parçalanmaktadır [42, 46]. Buna ilaveten, geniş kapsamlı bir inhibitörün uygulanmasıyla ya da endojen kaspaz inhibitörü XIAP'ın transgenik artışıyla kaspaz-3 etkinliği ve Hİ hasarının önemli oranda azaltılabileceği belirtilmiştir [47, 48].

#### 4.1.4. İnflamasyon ve sitokin salınımı

Hİ, ilk hasardan sonra birkaç hafta sürebilecek enflamatuar süreçleri tetiklemektedir. Mikroglia, beyinde bulunan yerleşik bağışıklık hücreleridir ve aktivasyonu Hİ durumunda enflamatuar yanıtların ilk aşamasıdır [49]. Fagositoz, enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinlerin üretimi, antijen sunumu ve kan-beyin bariyerinin (BBB) bozulmasına yol açan matriks metalloproteinaz (MMP) salınması gibi makrofaj benzeri işlevler geliştirirler [50]. Böylece periferik lökositler beyne nüfuz eder ve bağışıklık açısından normalde korunaklı olan beyin ortamı, inflamasyonu ve beyin hasarını daha da şiddetlendiren sistemik yanıtlara açık hale gelir [51]. Hİ hasarın meydana gelmesinden hemen sonra yenidoğanlar doğuştan gelen bir immün tepki başlatır [52]. Bu yanıt, hem astrosit hem de mikrogliaların yaralı nöronlar ve glial hücreler tarafından açığa çıkarılan pro-enflamatuar araçlar, sitokinler ve ROS ile aktive edilmesini sağlar [53]. Mikrogliaların M1 fenotipi nöron ölümünün artmasına yol açtığı düşünüldüğünden mikrogliaların klasik aktivasyon fenotipini düzenlemeye yönelik ilgi gittikçe artmaktadır [54]. Hastalık modellerindeki deneysel bulgular da hipoksinin indüklediği nöroinflamasyonda mikroglia aktivasyonunun önemini vurgulamaktadır. Gelişen beyindeki ameboid mikroglia Hİ'ye şiddetli bir yanıt vererek yaralı dokuda birikir ve glutamat, NO ve ROS ile beraber yüksek seviyede enflamatuar sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , vb.) üreterek oligodendrosit ölümlerine, aksonal bozulmaya ve immatür BBB'nin zarar görmesine neden olur [55, 56]. Mikroglia gibi bağışıklık sisteminin endojen hücreleri ve muhtemel istilacı hücreler erken dönemde toksik olabilir, fakat sonrasında antienflamatuar sitokin, trofik faktör salınımı ve yaralı hücrelerin fagositozu aracılığıyla hasarın ileriki safhalarında koruyucu bir fenotipe geçiş yapabilirler [57, 58]. Nitekim, mikroglia hücrelerinin ortadan kaldırılması, yenidoğan kemirgenlerde fokal iskemi sonrasında enflamatuar sitokin ve kemokin salınımıyla hasarı şiddetlendirerek mikrogliaların nöroprotektif etkileri olduğunu göstermektedir [59].

Mikroglialara benzer şekilde makrofajlar da MSS'nin çeşitli bölgelerinde yaşar ve gelişim sürecinin erken evrelerinden beri erişkin MSS'de bulunduğu kabul edilen mikrogliaların aksine dolaşımdaki monositler tarafından devamlı yenilenebilir [60]. Buna karşın, yapılan bir çalışmada, iskemik beyinde ölmekte olan mikrogliaların,

periferik monositler veya makrofajların yaralı bölgeye nüfuz ederek mikrogliyal fenotipler kazanmasıyla yenilenebileceğini öne sürmektedir [61].

Astrositlerin aktivasyonunun Hİ'de hem yıkıcı hem de iyileştirici etkileri olduğu düşünülmektedir. İnsan yenidoğanın beyinde astrositler 20 ila 23 haftalık gestasyona kadar reaktif hale gelmez ve yaralanma uyarılarına duyarlı değildir [62]. Yetişkin iskemi modellerinde elde edilen bulgularla paralel olarak, P7 sıçan yenidoğanlarında astrositler iskemik çekirdek içerisinde nadir olarak gözlenirken, Hİ'den 24 saat sonra penumbra alanlarında yoğun olarak görülmektedir [63]. Reaktif astrositler IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ve  $\beta$  ve interferon  $\gamma$  gibi pro-enflamatuar sitokinler üretebilir [64]. Genel olarak, sitokinlerin rolleri pleiotropiktir ve genel etkilerin iskemik hasar durumunda pro- veya anti-inflamatuar olup olmadığı, HİE'ye kıyasla daha geniş veri bulunan yetişkin modellerinde bile tartışmalıdır. Sitokinlerin seviyelerindeki ani yükselmeler, nöronal hücrelerin apoptozunu indükleyerek, toksik NO düzeylerini yükselterek ve nörojenezi inhibe ederek iskemik hasarı şiddetlendirmektedir [51]. YHİ'li bebeklerin P1, P3 ve P7'deki periferik kan numunelerinde IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri kontrol grubuna oranla daha yüksektir ve IL-1 $\beta$  seviyeleri YHİ şiddeti ile pozitif korelasyon içindedir [65]. Ayrıca, erken proenflamatuar dönemdeki bulgular, trombosit aktifleştirici faktörün, IL-1 $\beta$ , IL-18 ve bunların aktivasyonunu sağlayan kaspaz-1'in inhibisyonu beyin hasarını önlediğini göstermektedir [66, 67]. IL-1'in YHİ patolojisinde fonksiyonel olarak yıkıcı olduğuna dair en güçlü kanıt, kemirgenlerdeki YHİ modellerindeki IL-1 reseptör antagonisti uygulamasının nöroprotektif potansiyeliyle sağlanmıştır [68].

#### **4.2. TAM reseptör ailesi**

Reseptör tirozin kinazlar (RTK), hücrenin yaşamsal süreçlerini etkileyen sitoplazmik sinyal kaskadlarının başlatılmasında önemli role sahip olan bir grup transmembran proteindir. RTK'lar hücre dışı sinyal moleküllerini tanıyarak dimerize olur ve iç alandaki tirozin kalıntılarının fosforile olmasıyla çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlar [69]. Normal fizyolojik süreçlerin kilit düzenleyicileri olan bu reseptörler, çok sayıda sinir sistemi hastalığının gelişiminde ve ilerlemesinde kritik role sahiptir [70]. Buna ek olarak, artan RTK ekspresyonunun birçok kanser türünün gelişimine sebep olduğu bilinmektedir [71].

RTK'lar, kinaz bölgesindeki amino asit sekansının farklılığına ve hücre dışındaki bölgelerinin yapısal benzerliğine dayanarak 20 farklı grupta sınıflandırılır [72]. TAM reseptör alt grubu; immünite, sinir ve damar fonksiyonlarının homeostazisini korumasındaki önemi sebebiyle son zamanlarda artan bir ilgi görmüştür [73].

TAM reseptör ailesi doku homeostazının sağlanması, immün cevabın düzenlenmesi, fagositoz, apoptotik hücrelerin temizlenmesi gibi önemli fizyolojik görevlere sahiptir ve hakkında en çok çalışma tümör oluşumunda gerçekleştirilmiştir. Farklı kanser türlerinde, TAM kinazların aşırı ekspresyonunun olduğu bildirilmiştir. Bu reseptörlerin tümör hücrelerinde indüklenmesi hayatta kalımı, kemorezistansı ve hareketliliği destekler. İnhibisyonu ise antitümör bağışıklığı ve kemosensitiviteyi artırırken, hücrelerin canlılığını ve metastatik potansiyeli azaltır [74, 75].

Nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalıklarda TAM'ların rolüne dair kanıtlar hızla artmaktadır. Bu tirozin kinazların, mikroglial aktivasyonu ve fagositozu etkileme kapasitesiyle Parkinson hastalığının patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, Alzheimer hastalığının belirteci olan amyloid birikiminin mikroglial aktivasyon ile temizlenmesinde de etkilidir [76]. Buna rağmen, TAM ailesinin ve ligandlarının sinir sistemindeki fonksiyonları yeterli bir şekilde çalışılmamıştır.

#### **4.2.1. TAM reseptörlerinin yapısı, ligandları ve ekspresyon profilleri**

TAM reseptör ailesi Tirozin kinaz reseptörü 3 (Tyro3), Axl ve Mer olmak üzere üç ana üyeyi içerir. Yapısal olarak adhezyon molekülüne benzeri hücre dışı bölge, tek geçişli  $\alpha$ -helikal transmembran bölge ve korunmuş hücre içi tirozin kinaz alanından oluşurlar. Kinaz alanındaki korunmuş sekans, KW(I/L)A(I/L)ES, reseptörün aktifleşmesi ve aşağı yönlü sinyal aktarımında kritik bir motif olarak kabul edilir [71]. Hücre dışı bölge yapısındaki iki immunoglobulin (Ig) benzeri ve iki fibronektin-tipIII (FNIII) alan hücre-hücre bağlantılarının kurulmasında önemli olduğu düşünülmektedir [77].

TAM reseptörlerini diğer RTK'lardan ayıran en önemli fark spesifik ligand profiline sahip olmalarıdır. TAM kinazlar Gas6 adı verilen büyüme faktörü

tarafından aktive edilebilirler [78]. Yapılan çalışmalar, erken embriyonik dönemde ifadesi az olsa da zamanla artarak yetişkin nöronlarda ekspresyon seviyesinin yükseldiğini göstermiştir [79]. Gas6 serebral korteks, hipokampus, serebellum, thalamus gibi beyin bölgelerindeki nöron ve endothel hücreler tarafından eksprese edilir [80]. Yapısal olarak homolog olan Protein S, Tyro3 ve Mer reseptörlerinin ligandıdır ancak Axl için değildir. Protein S ifadesi MSS' de düşük seviyede olsa da hipokampus, derin kortexteki piramidal nöronlar, astrositlerde varlığı bilinmektedir [81].

TAM ailesinin tüm üyeleri gelişmekte olan ve yetişkin sinir sisteminde ifade edilmektedir. Yetişkin merkezi sinir sisteminde (MSS) en geniş ekspresyona sahip olan Tyro3'tür. Sıçanlarda Tyro3 ifadesi embriyonik dönemde çok düşükken, ikinci postnatal dönemde önemli ölçüde artarak yetişkin MSS'de sabit seviyeye ulaştığı bilinmekte olup sinaptogenez ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [82]. Periferik sinir sisteminde (PNS), dorsal kök gangliyonu nöronlarında ve Schwann hücrelerinde ayrıca hematopoietik hücrelerden platelet ve makrofajlarda da eksprese edilmektedir [83, 84]. Axl ve Mer, Tyro3'e kıyasla daha düşük seviyede olsa da gelişimsel süreçlerde sabit düzeyde ifade edilir [85]. Axl ekspresyonunun PNS'nde Schwann hücrelerinde, serebellum ve hipokampüste oligodendrositlerde, astrositlerde ve mikrogliyalarda var olduğu bilinmektedir [86, 87]. Axl ifadesi çoğunlukla epitel hücrelerde görülürken, Mer daha spesifik olarak hematopoietik kökenli hücrelerde eksprese edilir [88]. Bunlar arasında monosit, makrofaj, platelet, dendritik ve doğal öldürücü hücreler en bilinen örneklerdir [89].

#### **4.2.2. MerTK fonksiyonları ve etkili olduğu sinyal yolları**

TAM ailesinin bir üyesi olan MerTK'nın fonksiyonları, yenidoğan hipoksik iskemisinde patofizyoloji ve muhtemel terapötik müdahalelerle ilişkilendirilebilir. MerTK'nın YHİ sonrasında ölü ve ölmekte olan hücrelerin temizlenmesi, immünolojik toleransın sürdürülmesi ve inflamasyon için kritik bir öneme sahiptir.

Astrositlerde ve mikrogliyalarda yüksek seviyede eksprese edilen MerTK, apoptotik hücreleri tanıma ve onlarla etkileşime girebilme kabiliyetine sahiptir [90]. MerTK ile apoptotik hücrelerin yüzeylerindeki Gas6 veya Protein S ligandları

etkileşimi efferositoz sistemini tetikler [91]. Spesifik ligandlarının varlığında aktifleşen MerTK, aktin iskeletinin düzenlenmesi ve fagositoz için gereken PI3K/Akt ve MAPK/ERK yollarını indükler [92, 93]. Ayrıca, makrofajlardaki apoptotik hücre fagositozunu sağlayan ana reseptör MerTK'dır ve inhibisyonu apoptotik hücre temizliğini tamamen ortadan kaldırır [94]. MerTK'nın artan bölünmesi yetişkin sistemik lupus eritematozusda (YSLE) hastalık aktivitesi ile korelasyon gösterir ve bu durum YSLE'de görülen apoptotik hücre temizliğindeki önemli eksikliğin sebebi olabilir [95, 96].

Mikroglialarda ifade edilen Mertk, miyeloid insan hücreleri vasıtasıyla miyelin fagositozunda görev aldığına dair bulgular mevcuttur [97]. Mertk'nın nöronal hasar sonrası Schwann hücrelerinin miyelin atıklarının temizlenmesinde de önemli bir rolü olduğu bilinmektedir [98]. Multiple skleroz (MS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda, demiyelinizasyon sürecinde ortaya çıkan miyelin kalıntıları, remiyelinizasyon ve rejenerasyonun güçlü bir inhibitörü olduğu düşünülmektedir [99]. Bunlara ek olarak MerTK'nın Gas6 ile etkinleştirilmesinin, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar başta olmak üzere enflamatuar cevabı azalttığı gözlenmiştir [100]

MerTK'nın YHİ'ne özgül katkısını aydınlatmak için daha fazla çalışma yapılmasını gerektirse de işlevlerinin ve ilgili sinyal kaskadlarının hedeflenmesi YHİ'nin altında yatan sistemleri aydınlatmaya ve sonuçlarını hafifletmek için potansiyel terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açacağı düşünülmektedir. Bu nedenle tez kapsamında, MerTK'nın YHİ üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 5. MATERYAL METOT

### 5.1. Deney planı ve deney grupları

Bu tez çalışmasındaki deney hayvanı prosedürlerinin tümü etik standartlara, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmış olup İstanbul Medeniyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Deneylerde cinsiyet ayırt etmeksizin yeni doğmuş 7 günlük 21 adet Yabanıl Tür (WT, C57BL6/J9) ve 21 adet MerTK Knockout (K/O, (B6;129-Mertktm1Gr1/J Strain: #011122, The Jackson Laboratory) fareleri kullanılmıştır. Proje kapsamında planlanan deney setleri için fareler İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü bünyesinde faaliyet gösteren Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM)'da başarılı bir şekilde üretilmiş olup tüm fareler teslim edilmiştir.

Doğum yapan anne farelerin yavruları yenidoğan hipoksi iskemi modeli uygulanmak üzere değerlendirilmiştir. Projede belirlenen amaçlara ulaşılabilmesi için aşağıda açıklanan 6 farklı deney grubu dizayn edilmiştir.

**Doğaltür sham:** C57BL/6 farelerinin boğaz kısmı cerrahi olarak açılmış ve herhangi bir işlem yapılmadan tekrardan kapatılmıştır. Bu gruba başka herhangi bir işlem uygulanmamıştır (n=7).

**Doğaltür HI + taşıyıcı:** C57BL/6 farelere P7'de HI modeli gerçekleştirilmiş ve hasar sonrası 60. saatte UNC2025'in taşıyıcısı oral gavaj ile uygulanmıştır (n=7).

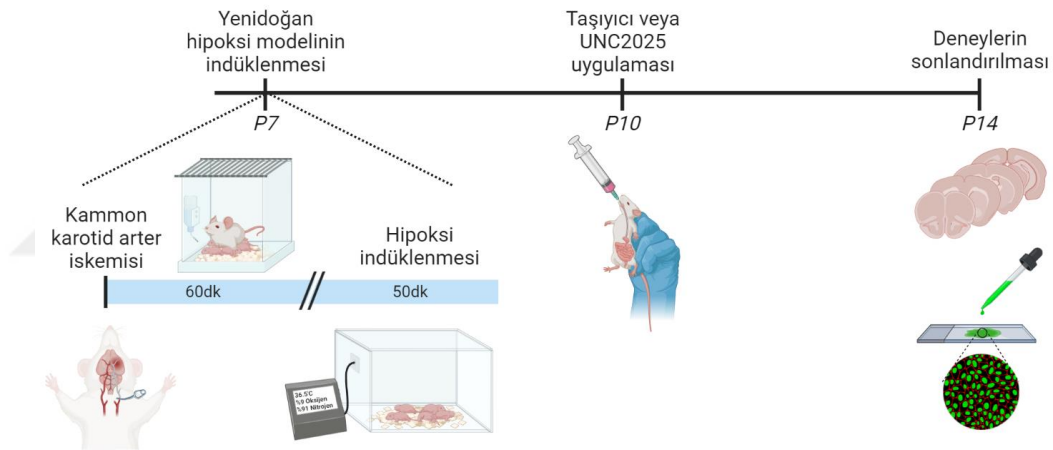
**Doğaltür HI + UNC2025:** C57BL/6 farelere P7'de HI modeli gerçekleştirilmiş ve hasar sonrası 60. saatte 65 mg/kg dozunda UNC2025 oral olarak uygulanacaktır (n=7).

**K/O sham:** B6;129-Mertktm1Gr1/J farelerinin boğaz kısmı cerrahi olarak açılmış ve herhangi bir işlem yapılmadan tekrardan kapatılmıştır. Bu gruba başka herhangi bir işlem uygulanmamıştır (n=7).

**K/O HI + taşıyıcı:** B6;129-Mertktm1Grl/J farelere P7'de HI modeli gerçekleştirilmiş ve hasar sonrası 60. saatte UNC2025'in taşıyıcısı oral gavaj ile uygulanmıştır (n=7).

**K/O HI + UNC2025:** B6;129-Mertktm1Grl/J farelere P7'de HI modeli gerçekleştirilmiş ve hasar sonrası 60. saatte 65 mg/kg dozunda UNC2025 oral olarak uygulanmıştır (n=7).

MerTK'nın akut dönem etkilerinin ortaya çıkartılması için farelere hipoksi iskemisi uygulamasından 60 saat sonra inhibitör ve taşıyıcı uygulamaları yapılacaktır. P7'de hipoksi iskemisi indüklenerek ve P14'te deney sonlandırılacaktır. Sakrifiye edilen hayvanların beyinleri hızla çıkartılacak ve genel hasar analizi, nöronal sağkalım, apoptotik hücre, protein ve gen çalışmaları yapılacaktır.



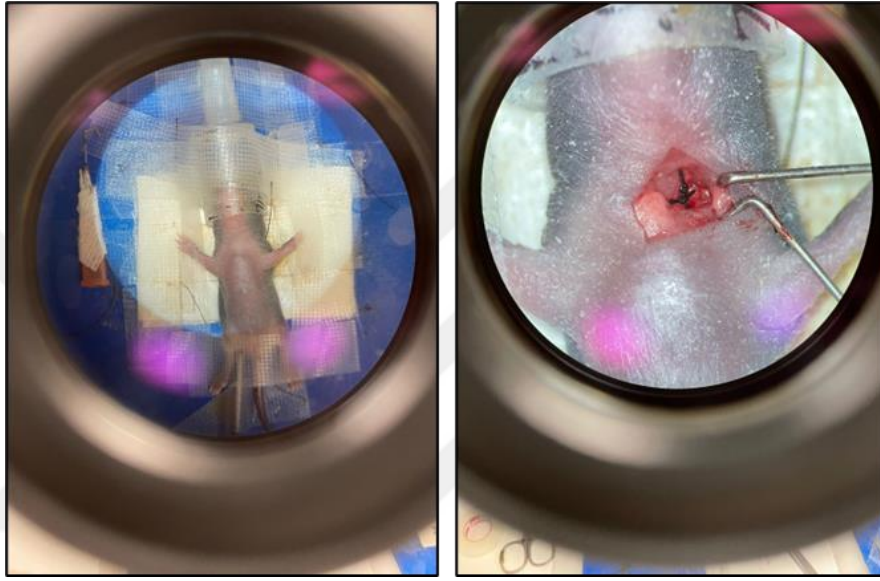
Şekil 5.1.1 Çalışmanın genel planı.

## 5.2. Deney hayvanı çalışmaları

### 5.2.1. Yenidoğan hipoksi iskemisi modeli

Doğum sonrası 7. günde hayvanlar cinsiyet gözetmeksizin gaz anestezi sistemiyle (%1'lik izofloran (N0015A09, Adeka) (%30 O<sub>2</sub>, düzenleyici olarak N<sub>2</sub>O) anesteziye alınmıştır. Operasyon boyunca farelerin vücut sıcaklıkları 36.5-37°C'de sabit tutulması için ısıtıcı sistemler kullanılmıştır (69020, ThermoStar Homeothermic Monitoring System, RWD). Yenidoğan hipoksi iskemisi modeli oluşturmak için Vanucci'nin geliştirdiği model modifiye edilmiştir (Şekil 5.1.1.).

Boyun bölgesine orta hattan kesi atılarak sağ kammon karotid arter izolasyonu yapılmıştır. Kammon karotid arter, 6/0 ipek ipe (S1165, Doğsan) çözülme riskine karşı iki farklı bölgeden olmak üzere kalıcı olarak bağlanmıştır. Ardından, farenin boyun derisi 5/0 ipek ip (S2165, Doğsan) kullanılarak dikilmiş ve 60 dk süre ile kendi kafeslerine geri alınmıştır. Sonrasında, fareler yine vücut sıcaklıkları 36.5-37°C’de sabit tutulacak şekilde içerisi %9 O<sub>2</sub> ve %91 N<sub>2</sub> olan hipoksik kaplara 50 dakika boyunca konulmuştur.



**Şekil 5.2.1.2** Yenidoğan hipoksi iskemi operasyon ünitesi ve P7 hipoksi kammon karotid arter iskemi yöntemi.

Yenidoğan fareler sakrifiye edilinceye kadar operasyon sonrası bakım için annelerinin yanına bırakılmıştır. Annelerinin yanına bırakılan hayvanlarda herhangi bir kanibalizm gerçekleşmemesi için hem iskemi modelinde hem de taşıyıcı veya inhibitör uygulama esnasında çalışmacılar çift kat eldiven kullanarak kendi kafeslerinin içindeki talaş eldivenlere sürülerek kendi kokularının haricinde başka kokuların alınmasının önüne geçilmiştir. Ayrıca, farklı annelerin yavruları alınırken eldivenler değiştirilmiştir.



**Şekil 5.2.1.3.** %9 O<sub>2</sub> ve %91 N<sub>2</sub> olan yenidoğan hipoksi çemberi ünitesi.

Hayvanların sakrifikasyonu, P14'te izofloran ile derin anestezi altında dekapitasyon yöntemiyle yapılmıştır. Hemen sonra disekte edilen beyin kuru buz üzerinde dondurulmuştur ve kesim işlemi gerçekleşinceye kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **5.3. İnhibitör uygulaması**

UNC2025 MerTK spesifik olarak geliştirilmiş biyo-uyumlu ve oral olarak uygulanabilen ve en önemlisi kan beyin bariyerini geçebilen bir moleküldür. Yarılanma ömrü 3.8 saattir, salin içerisinde hızlıca çözünebilmekte ve 24 saate kadar MerTK fosforilasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [29, 101]. Neher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MerTK ifadesinin beyin felci sonrası 3. günde aktive olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple ilgili gruplara hasar sonrası 60. saatte oral gavaj yoluyla inhibisyon uygulaması yapılmıştır [102]. Oral gavaj işlemi 30 ul'de 65 mg/kg olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### 5.4. Cryostat cihazı kullanılarak beyinlerin kesilmesi

Beyinlerin kesim işlemi soğuk alan mikrotomunda (Cryostat, CM1950, Leica) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen beyinlerden 1 mm aralıklarla 18 µm kalınlığında koronal beyin kesitleri pozitif yüklü lamalar üzerine alınmıştır. Dokuların cama sabitlenmesi amacıyla camlar 30 dk boyunca 40°C sıcaklığındaki ısıtıcı tabla üzerinde bekletilmiştir.

Alınan koronal beyin kesitlerine Cresyl Violet boyaması ve TUNEL boyaması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, beyin hasarının yoğunlaştığı bölgeler olan hipokampus ve striatum bölgelerinden protein analizleri yapmak amacıyla doku örnekleri toplanmıştır.

#### 5.5. Cresyl violet boyaması

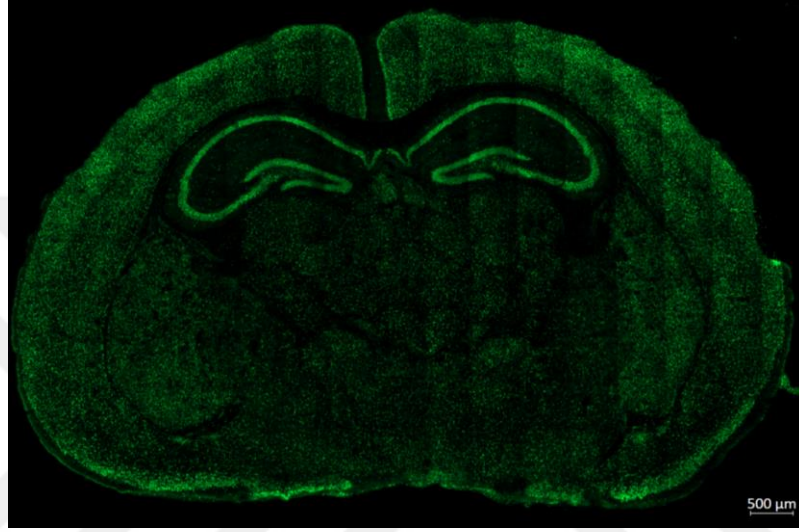
Cryostat cihazı ile 1 mm aralıklarla alınan koronal kesitlere Cresyl Violet (C5042, Cresyl Violet Acetate, Sigma) boyaması literatürde yer alan makalelerimizdeki prosedürler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Cresyl Violet canlı nöron hücre gövdelerinde bulunan özelleşmiş bir tür endoplazmik retikulum olan Nissl cisimciklerine bağlanarak mavi-mor renk verir. Dolayısıyla doku hasarı olan bölgelerdeki ölü hücreler renk değiştirmez ve kontrast farklı oluşur. Boyanan kesitler tarayıcı ile taratılarak, Image J (National Institute of Health) programı yardımıyla deney gruplarındaki beyin hacmi, atrofi ve hasar alanı analizi yapılmıştır.



Şekil 5.5.1 Cresyl Violet boyalı kesit görüntüsü.

## 5.6. NeuN boyaması

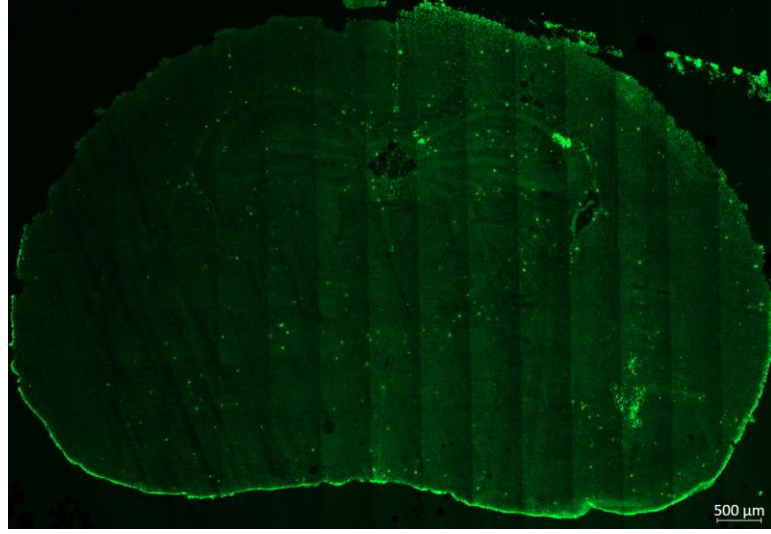
Yenidoğan hipoksi iskemisi sonrasında hayatta kalan nöronların belirlenmesi için koronal beyin kesitlerine immünfloresan bir yöntem olan nöronal çekirdek (NeUN, (MAB377X, Millipore) boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonucunda elde edilen örnekler lazer taramalı konfokal mikroskop (LSM780; Carl Zeiss, Jena) aracılığıyla analiz edilmiştir.



Şekil 5.6.1 NeuN boyaması yapılmış kesitin taramalı konfokal mikroskop görüntüsü.

## 5.7. TUNEL boyaması

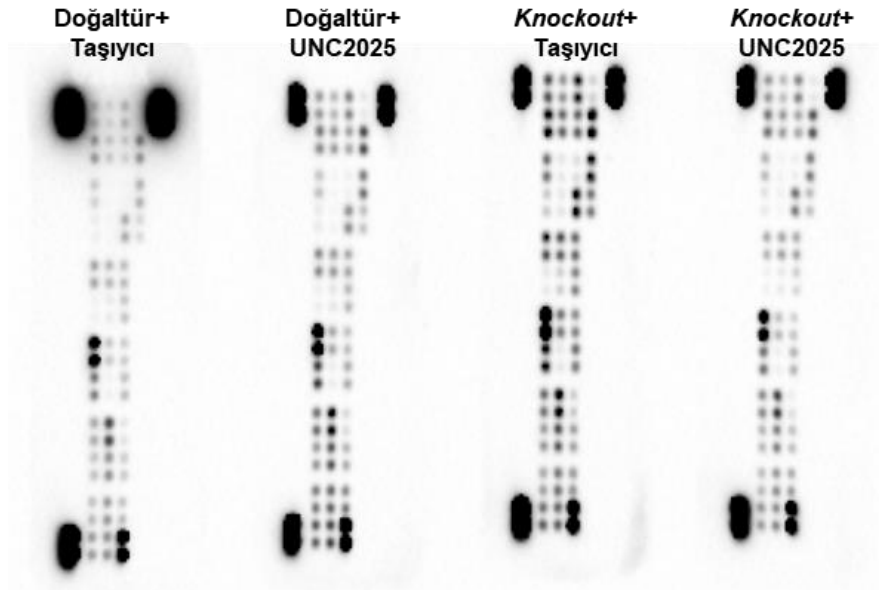
DNA kırıkları TUNEL boyaması ile işaretlenerek yenidoğan hipoksik iskemisi sonrasında apoptoza giden hücrelerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Deney gruplarına, In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (11684795910, Roche) kiti uygulanmıştır. Örneklerin görüntülenmesi konfokal mikroskop (LSM800, Carl Zeiss, Jena) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.7.1 TUNEL boyanan kesitin konfokal mikroskop görüntüsü.

### 5.8. Sitokin ve kemokin profili

Akut YHİ modeli sonrasında hasarlı hemisferden alınan doku örneklerinden anti-/pro- inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin analizleri Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A (ARY006, R&D System) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı grupta bulunan örnekler birleştirilerek liziz tampon çözeltisiyle homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örneklerdeki protein miktarları Qubit 3.0 Fluorometre (İnvitrogen) cihazı kullanılarak üreticinin belirtmiş olduğu talimatlara esas alınarak ölçülmüştür. Sonrasında Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A (ARY006, R&D System) için üreticinin talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirilmiş ve panel kemilüminesans olarak görüntülenmiştir (ChemiDoc kemilüminesans görüntüleme cihazı, Bio-Rad).



Şekil 5.8.1 Deney gruplarında sitokin ve kemokin analiz görüntüsü.

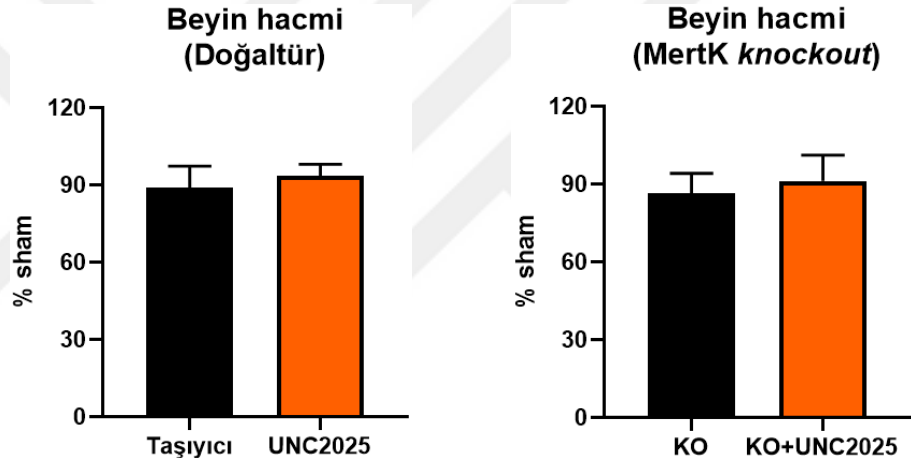
### 5.9. İstatistiksel analizler

Gruplar arasındaki (Doğaltür sham, Doğaltür HI + taşıyıcı, Doğaltür HI + UNC2025, K/O sham, K/O HI + taşıyıcı, K/O HI + UNC2025) farklılıkların belirlenmesi amacıyla istatistiksel analizler SPSS programı (Ibm) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü (*one-way*) varyans analizi (*Analysis of varitaion*, ANOVA) kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle (*least significant difference*, *LSD test*) analiz edilmiştir. Bütün değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiş, \* $p < 0,05$  ve \*\* $p < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 6. BULGULAR

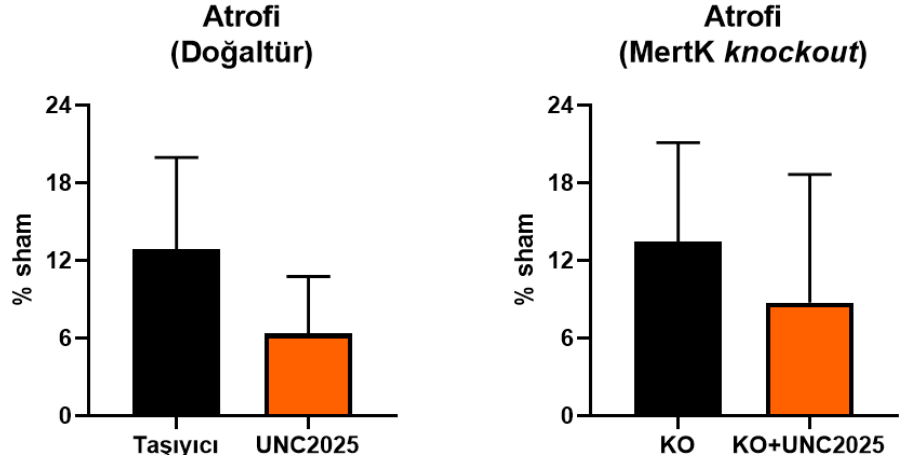
### 6.1. Beyin hacmi, atrofi ve hasar alanı analizi

Cryostat cihazı ile 1 mm aralıklarla alınan koronal kesitlere Cresyl Violet boyaması gerçekleştirilmiştir. Cresyl Violet canlı nöron hücre gövdelerinde bulunan özelleşmiş bir tür endoplazmik retikulum olan Nissl cisimciklerine bağlanarak mavimor renk verir. Dolayısıyla doku hasarı olan bölgelerdeki ölü hücreler renk değiştirmez ve kontrast farklı oluşur. Bu farkın Image J (National Institute of Health) programı yardımıyla analizi yapılarak beyin hacmi, atrofi ve hasar alanı hesaplanmıştır.



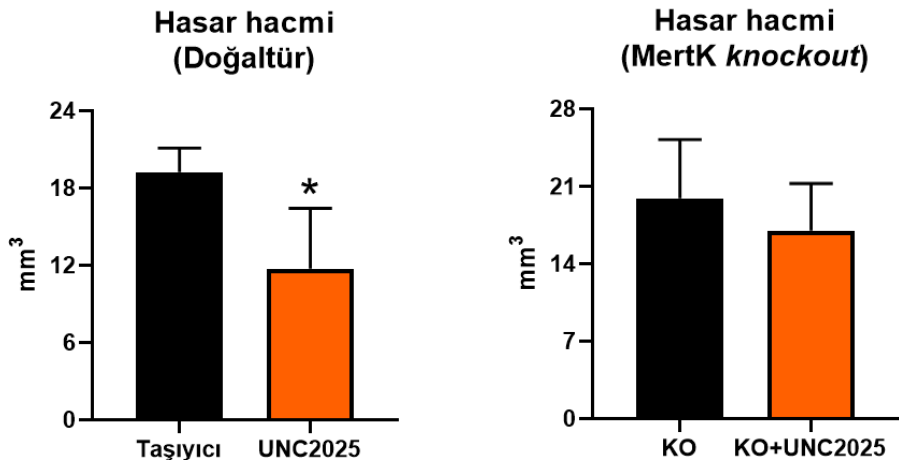
**Şekil 6.1.1.** Beyin hacmi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6) ve doğaltür + UNC2025 (n=6) (A), Knockout taşıyıcı (n=7) ve Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin hacmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

Taşıyıcı gruplarına UNC2025'in çözücüsü olarak kullanılan serum fizyolojik uygulanmıştır. Hİ sonrasında beyin hacminde hem doğaltür hem de knockout gruplarında herhangi bir istatistiksel anlamlılık görülmemektedir (**Şekil 6.1.1.**)



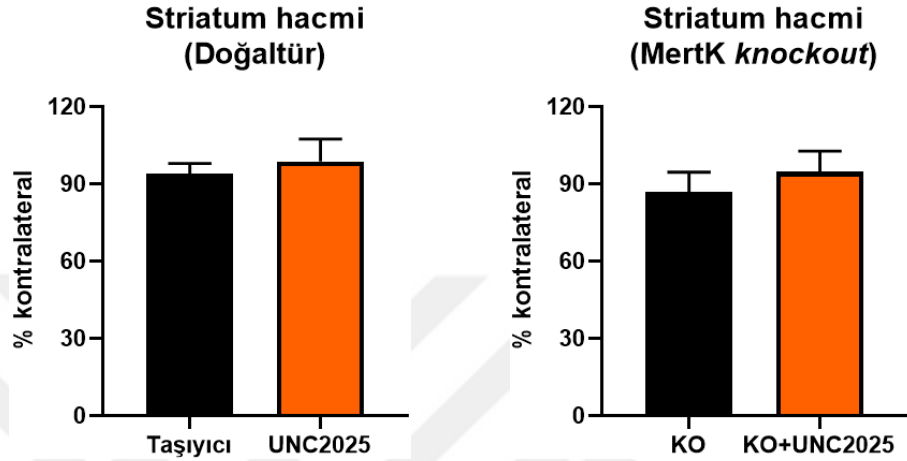
**Şekil 6.1.2.** Beyin atrofi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6) ve doğaltür + UNC2025 (n=6) (A), Knockout taşıyıcı (n=7) ve Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin atrofi üzerine etkisini göstermektedir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

Hİ sonrası beyin atrofi analizinde doğaltür + UNC2025 grubunda doğaltür taşıyıcı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın azalma görülmektedir (Şekil 6.1.2A.). Bu bulguyla paralel olarak, Knockout + UNC2025 grubunun Knockout taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmaksızın azaldığı gözlemlenmektedir (Şekil 6.1.2B.).

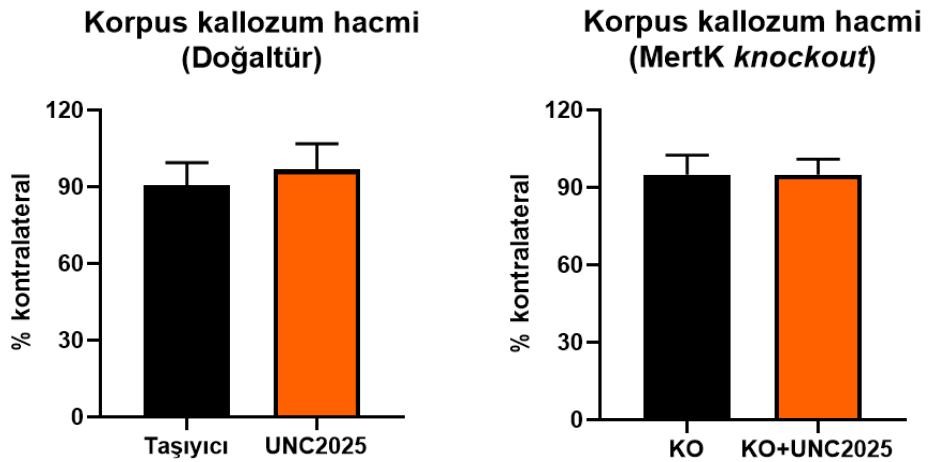


**Şekil 6.1.3.** Beyin hasar hacmi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6) ve doğaltür + UNC2025 (n=6) (A), Knockout taşıyıcı (n=7) ve Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin hasar hacmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir ve \* $p \leq 0.05$  istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Beyin hasar hacmi analiz edildiğinde doğaltür + UNC2025 grubunun doğaltür taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 6.1.3A.). Knockout grupları arasında ise UNC2025 uygulamasının hasar hacmini azalttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 6.1.3B.).



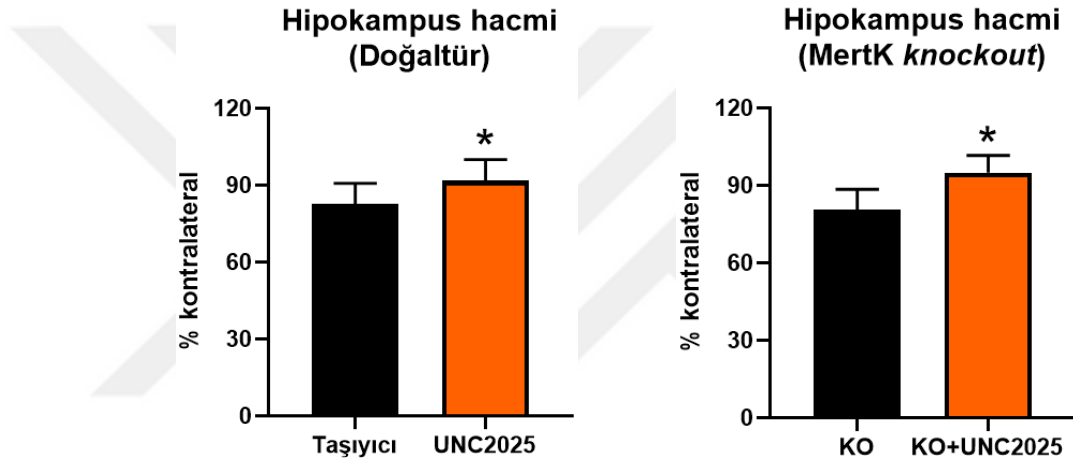
Şekil 6.1.4. Beyin striatum hacmi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6) ve doğaltür + UNC2025 (n=6) (A), Knockout taşıyıcı (n=7) ve Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin striatum hacmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.



Şekil 6.1.5. Beyin korpus kallozum hacmi analizi. Beyin striatum hacmi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6), doğaltür + UNC2025 (n=6) ve (A), Knockout taşıyıcı (n=7), Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin korpus kallozum hacmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

Doğaltür ve knockout grupları arasında striatum (Şekil 6.1.6.) korpus kallozum (Şekil 6.1.7.) ve hipokampus (Şekil 6.1.8.) alanlarındaki hasar hacmi kontralateral hemisferlere oranlanarak hesaplanmıştır.

Hİ sonrasında beyin striatum ve korpus kallozum hacimleri analiz edildiğinde doğaltür taşıyıcı, doğaltür + UNC2025 grupları arasında (Şekil 6.1.6A. ve Şekil 6.1.7A.) ve knockout taşıyıcı, knockout + UNC2025 grupları arasında (Şekil 6.1.6B. ve Şekil 6.1.7B.) anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Hem doğaltür hem knockout gruplarında UNC2025 uygulamasının hipokampus hacmini istatistiksel olarak arttırdığı görülmüştür (Şekil 6.1.8A. ve Şekil 6.1.8B.).



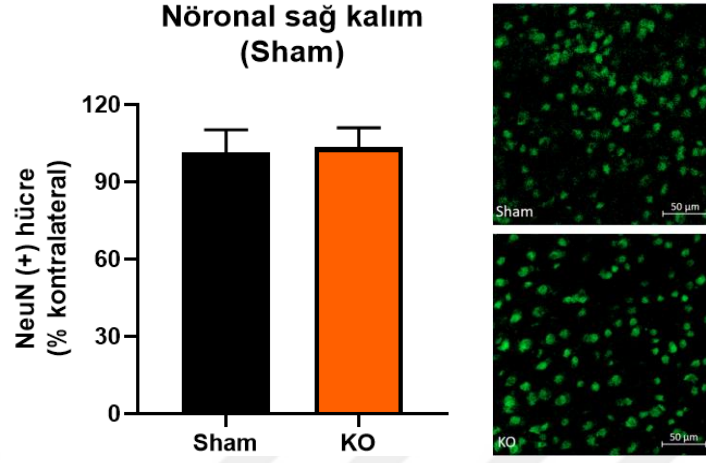
**Şekil 6.1.6.** Beyin hipokampus hacmi analizi. Beyin striatum hacmi analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6), doğaltür + UNC2025 (n=6) ve (A), Knockout taşıyıcı (n=7), Knockout + UNC2025 (n=7) (B) gruplarının beyin hipokampus hacmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

## 6.2. Nöronal sağkalım analizi

Yenidoğan hipoksi iskemisi sonrasında hayatta kalan nöronların belirlenmesi için koronal beyin kesitlerine immünfloresan bir yöntem olan nöronal çekirdek boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonucunda elde edilen örnekler lazer taramalı konfokal mikroskop aracılığıyla analiz edilmiştir.

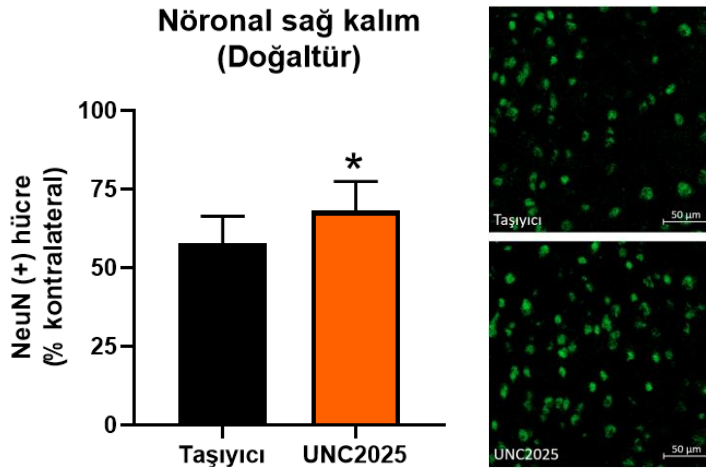
NeuN boyaması sonrasında elde edilen beyin görüntülerinden hasarlı hemisfer ve hasarsız hemisferin her biri için 16 farklı alanda ( $62.500 \mu\text{m}^2$ / alan) hayatta kalan

nöronlar sayılmıştır ve hasarlı hemisferdeki hücreler hasarsız hemisfere oranlanarak hücresel sağkalım belirlenmiştir (Şekil 6.2.1., Şekil 6.2.2. ve Şekil 6.2.3.).



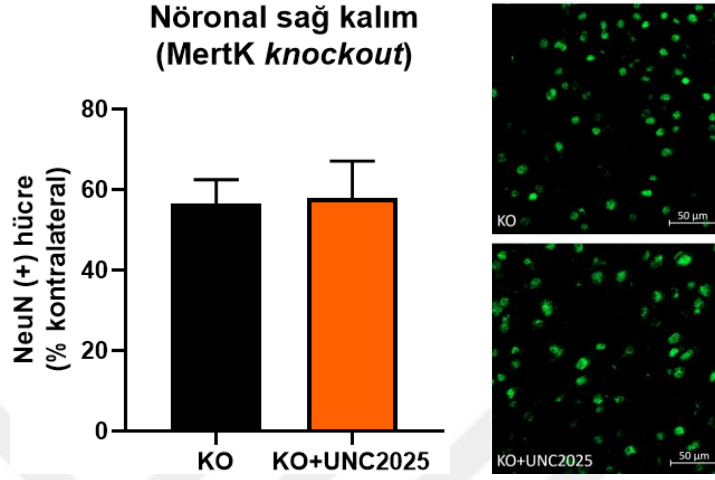
**Şekil 6.2.1.** Sham gruplarındaki nöronal sağkalım analizi. Doğaltür sham (n=7) ve MerTK knockout sham (n=7) farelerindeki nöronal sağkalım analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

Yapılan analizlerde sham grubundaki farelerin nöronal sağkalımın; iki hemisfer arasında ve gruplar arasında değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 6.2.1.).



**Şekil 6.2.2.** Doğaltür gruplarındaki nöronal sağkalım analizi. Doğaltür farelerine uygulanan taşıyıcı (n=6) ve inhibisyon (UNC2025) (n=6) sonrasındaki nöronal sağkalım analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir ve \* $p \leq 0.05$  istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Doğaltür + UNC2025 grubunun doğaltür taşıyıcı taşıyıcı grubuna kıyasla nöronal sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir (**Şekil 6.2.2.**).

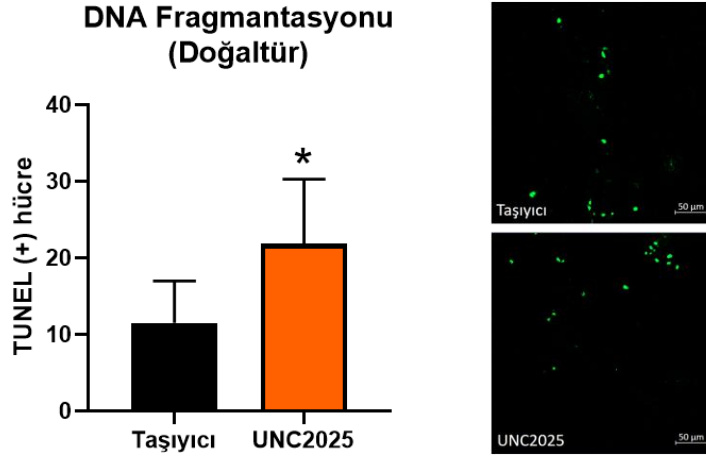


**Şekil 6.2.3.** Knockout gruplarındaki nöronal sağkalım analizi. Knockout farelerine uygulanan taşıyıcı (n=7) ve inhibisyon (UNC2025) (n=7) sonrasındaki nöronal sağkalım analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

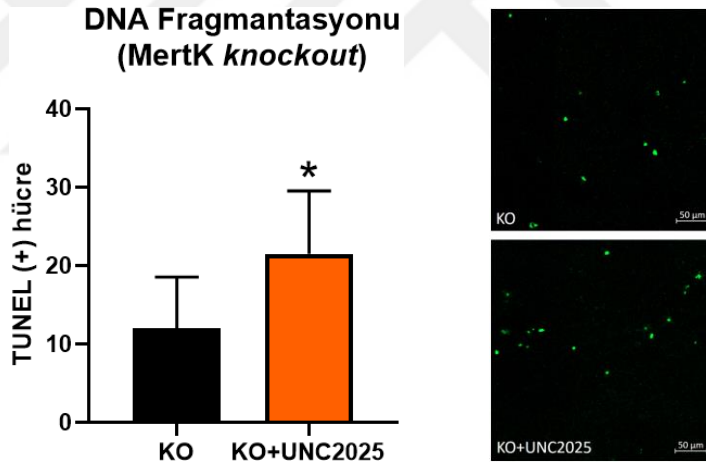
Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde akut dönemde UNC2025'in knockout farelerde hücresel sağkalıma bir etkisinin olmadığını göstermektedir (**Şekil 6.2.3.**).

### 6.3. DNA fragmantasyon analizi

DNA kırıkları TUNEL boyaması ile işaretlenerek yenidoğan hipoksik iskemisi sonrasında apoptoza giden hücrelerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Deney gruplarına, In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein kiti uygulanmıştır. Örneklerin görüntülenmesi konfokal mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen beyin görüntülerinden hasarlı hemisferde 16 farklı alanda ( $62.500 \mu\text{m}^2/\text{alan}$ ) TUNEL pozitif hücre sayılmıştır (**Şekil 6.3.1. ve Şekil 6.3.2.**)



**Şekil 6.3.1.** Doğaltür gruplarındaki DNA fragmantasyon analizi. Doğaltür taşıyıcı (n=6) ve doğaltür + UNC2025 (n=6) gruplarının ipsilezyonal hemisferlerindeki DNA fragmantasyonu üzerine etkisi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir ve  $*p \leq 0.05$  istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.



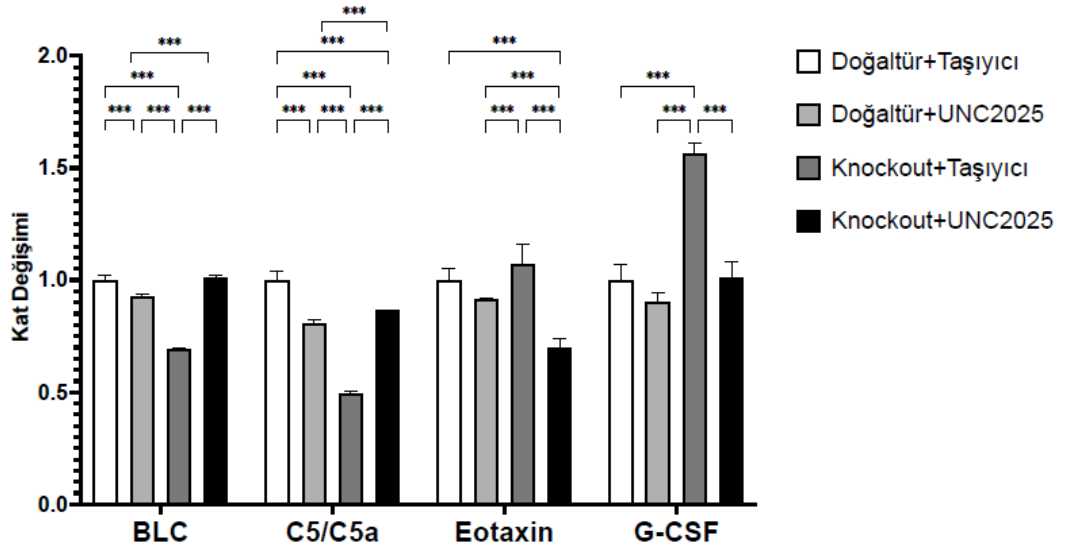
**Şekil 6.3.2.** Knockout gruplarındaki DNA fragmantasyon analizi. Knockout taşıyıcı (n=7) ve Knockout + UNC2025 (n=7) deney gruplarının ipsilezyonal hemisferlerindeki DNA fragmantasyonu üzerine etkisi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir ve  $*p \leq 0.05$  istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Proje kapsamında Knockout hayvanlar ve inhibitör UNC2025 kullanılarak MerTK'nın yeni doğan hipoksik iskemisi sonrası DNA fragmantasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Taşıyıcı gruplarına UNC2025'in çözücüsü olarak kullanılan serum fizyolojik uygulanmıştır. YHI sonrasında DNA fragmantasyonu analizinde doğaltür + UNC2025 grubunun doğaltür taşıyıcı grubuna

kıyasla DNA fragmantasyonu üzerine apoptotik hücre oluşumu istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür. Buna ek olarak, Knockout + UNC2025 grubunun Knockout taşıyıcı grubuna kıyasla DNA fragmantasyonu üzerine apoptotik hücre oluşumunu da istatistiksel olarak anlamlı olarak artmaktadır.

#### 6.4. Sitokin ve kemokin analizleri

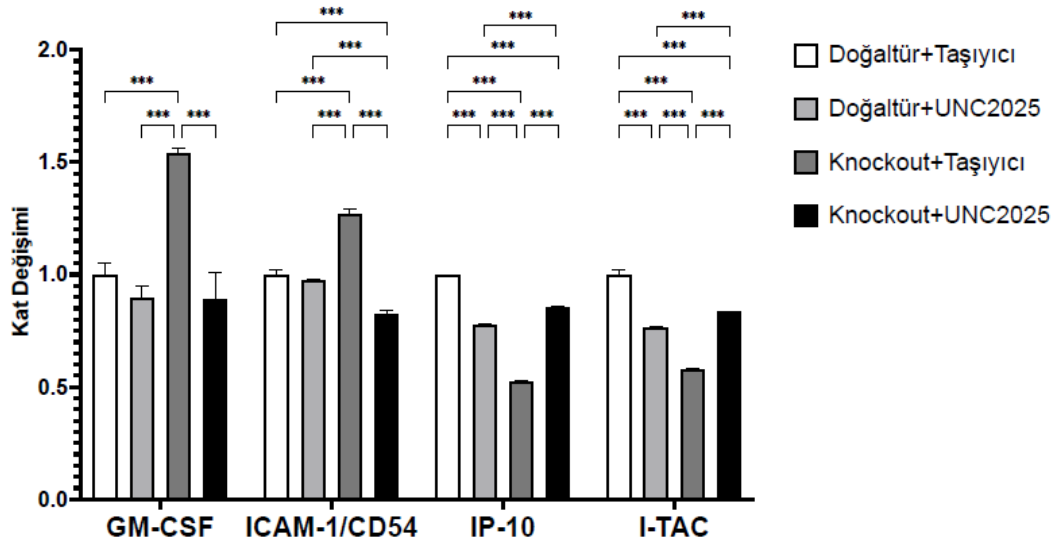
Akut YHİ modeli sonrasında hasarlı hemisferden alınan doku örneklerinden anti-/pro- inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin analizleri üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 6.4.1.** BLC, C5/C5a, Eotaxin ve G-CSF analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \* $p < 0.05$ / \*\* $p < 0.01$ / \*\*\* $p < 0.001$  istatistiksel farklılığı göstermektedir.

BLC pro-inflamatuvar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki BLC seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta BLC seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. C5/C5A hem pro- hem de anti-inflamatuvar etkileri olan bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki C5/C5A seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş

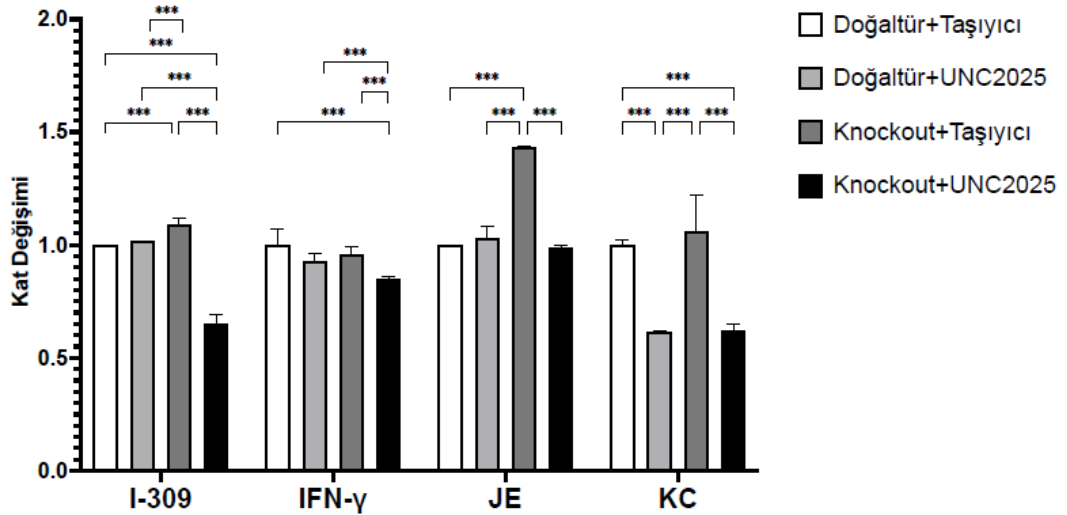
görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta C5/C5A seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Eotaxin pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki Eotaxin seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda bir düşüş görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlılık yoktur. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta Eotaxin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. G-CSF pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki G-CSF seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda bir düşüş görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlılık yoktur. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta G-CSF seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 6.4.1.).



**Şekil 6.4.2.** GM-CSF, ICAM-1, IP-10 ve I-TAC analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \* $p < 0.05$ / \*\* $p < 0.01$ / \*\*\* $p < 0.001$  istatistiksel farklılığı göstermektedir.

ICAM-1/CD54 pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki ICAM-1/CD54 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda bir düşüş görülmüştür ancak istatistiksel olarak

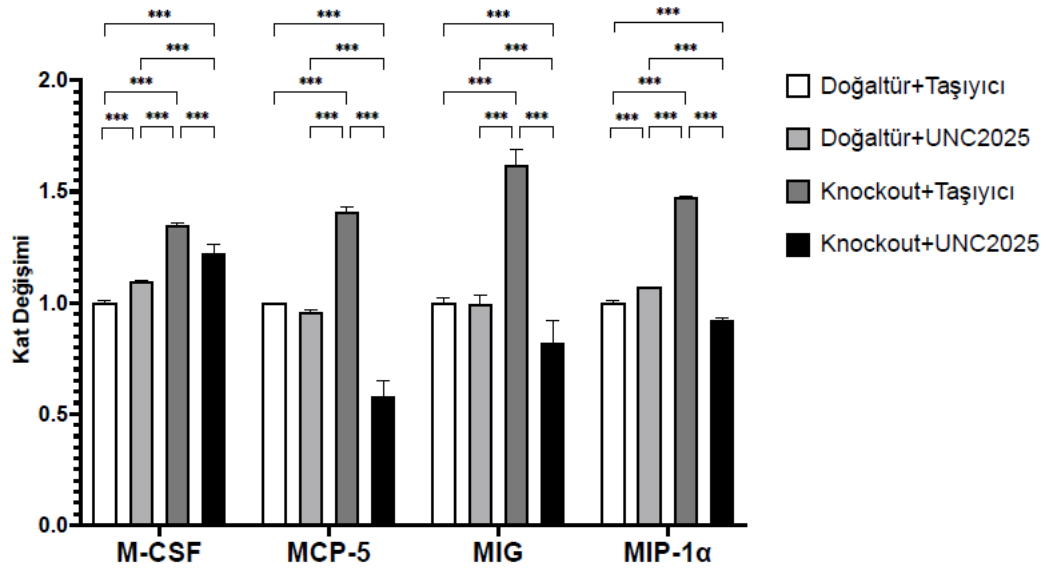
anlamlılık yoktur. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta ICAM-1/CD54 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. IP-10 pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IP-10 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IP-10 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. I-TAC pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki I-TAC seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta I-TAC seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Şekil 6.4.2.).



**Şekil 6.4.3.** I-309, INF-γ, JE ve KC analizi. Veri ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

I-309, ayrıca kemokin C-C motif ligand 1 (CCL1) olarak da bilinir, bir monosit kemoatraktandır. Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta I-309 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. İnterferon-gama (INF-γ)

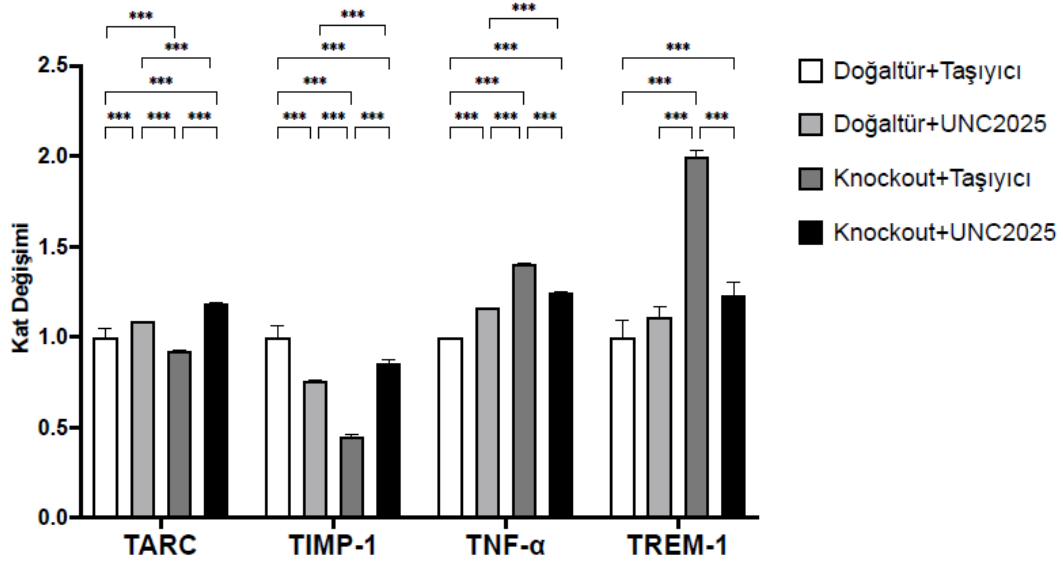
antiproliferatif, proapoptotik ve antitümör mekanizmalarına sahip bir pleiotropik moleküldür. Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IFN- $\gamma$  seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. JE, ayrıca kemokin C-C motif ligand 2 (CCL1) olarak da bilinir, hücre mekaniğini düzenleyerek bağışıklık sistemi hücrelerinin iltihaplanma bölgelerine toplanmasını sağlar. Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta JE seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. KC veya CXCL1 özellikle nötrofilleri hedef alan pro-inflamatuvar bir sitokindir. Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta KC seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş belirlenmiştir (Şekil 6.4.3.).



Şekil 6.4.4. M-CSF, MCP-5, MIG ve MIP1 $\alpha$  analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \* $p < 0.05$ / \*\* $p < 0.01$ / \*\*\* $p < 0.001$  istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Koloni uyarıcı faktör 1 (CSF1) olarak da bilinen makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), hematopoietik kök hücrelerin makrofajlara veya diğer ilgili hücre tiplerine

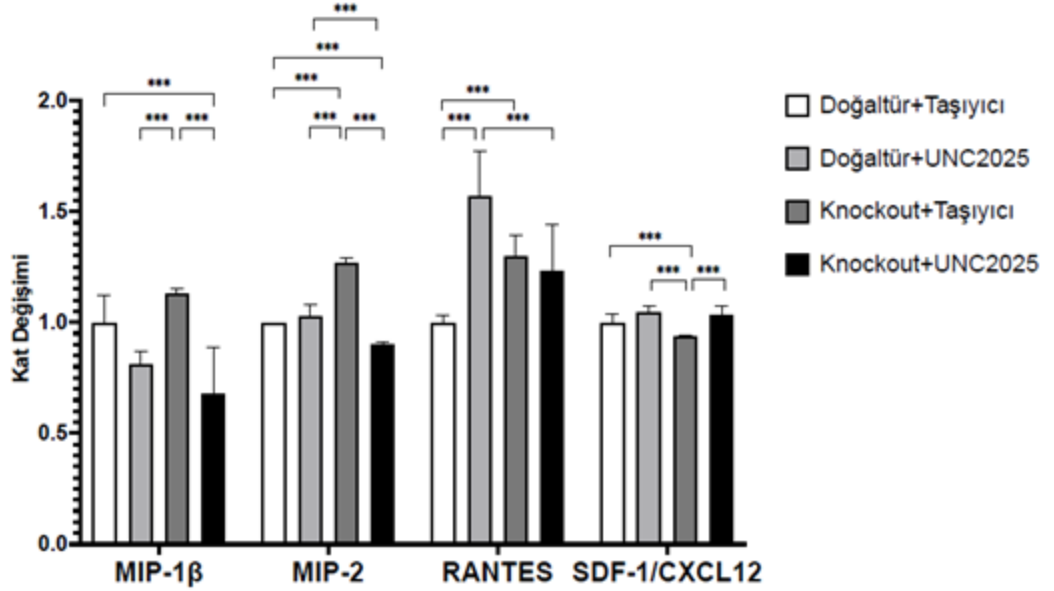
farklılaşmasını sağlayan bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki M-CSF seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta M-CSF seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Monosit kemotaktik protein-5 (MCP-5), kemokin ligandı 12 (CCL12) olarak da bilinen, farelerde tanımlanmış olan CC kemokin ailesine ait küçük bir sitokindir. Erken alerjik reaksiyonlar sırasında hücre hareketlerini ve patojenlere karşı bağışıklık tepkisini koordine ettiği düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki MCP-5 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda düşüş görülmüştür ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MCP-5 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Gamma interferon tarafından indüklenen monokin (MIG), kemokin ligandı 9 (CXCL9) olarak da bilinen CXC kemokin ailesine ait küçük bir sitokindir. Kemotaksiyi indüklemeye, lökositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını teşvik etmeye ve doku ekstrasvazasyonuna neden olmada rol oynar. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki MIG seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MIG seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. CCL 3 olarak da bilinen, makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), makrofajlar tarafından salgılanan bir kemokindir. Enflamatuvar hücrelerin toplanması, yara iyileşmesi, kök hücrelerin inhibisyonu ve efektör bağışıklık tepkisinin sürdürülmesi gibi çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirir. Kemik rezorpsiyon hücrelerini aktive eder ve doğrudan kemik yıkımını indükler. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki MIP-1 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MIP-1 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (**Şekil 6.4.4.**).



**Şekil 6.4.5.** TARC, TIMP-1, TNF $\alpha$  ve TREM-1 analizi. Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \* $p < 0.05$ / \*\* $p < 0.01$ / \*\*\* $p < 0.001$  istatistiksel farklılığı göstermektedir.

TARC (CCL17), timus ve dendritik hücreler, makrofajlar, monositler gibi antijen sunan hücreler tarafından üretilen güçlü bir kemokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki TARC seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta TARC seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. TIMP-1, metalloproteinazların doku inhibitörüdür. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki TIMP-1 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta TIMP-1 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. TNF- $\alpha$ , çok işlevli bir proinflatuar sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki TNF- $\alpha$  seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta TNF- $\alpha$  seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. TREM-1, proinflatuar kemokinlerin ve sitokinlerin salınımını uyarır. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki TREM-1

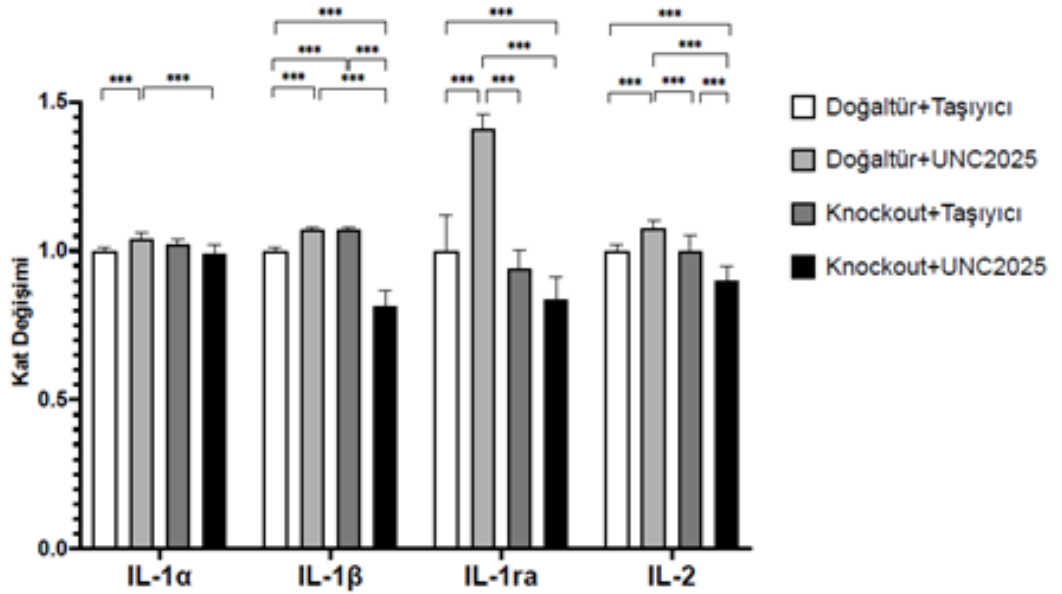
seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubu ve Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta TREM-1 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 6.4.5.).



Şekil 6.4.6. MIP-1β, MIP-2, RANTES ve SDF-1 analizi. Veri ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Makrofaj inflamatuvar protein-1β (MIP-1β) pro-inflamatuvar bir kemokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki MIP-1β seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MIP-1β seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) pro-inflamatuvar bir kemokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki MIP-2 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görülmektedir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MIP-2 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. RANTES (CCL-5) pro-inflamatuvar bir kemokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki RANTES seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025

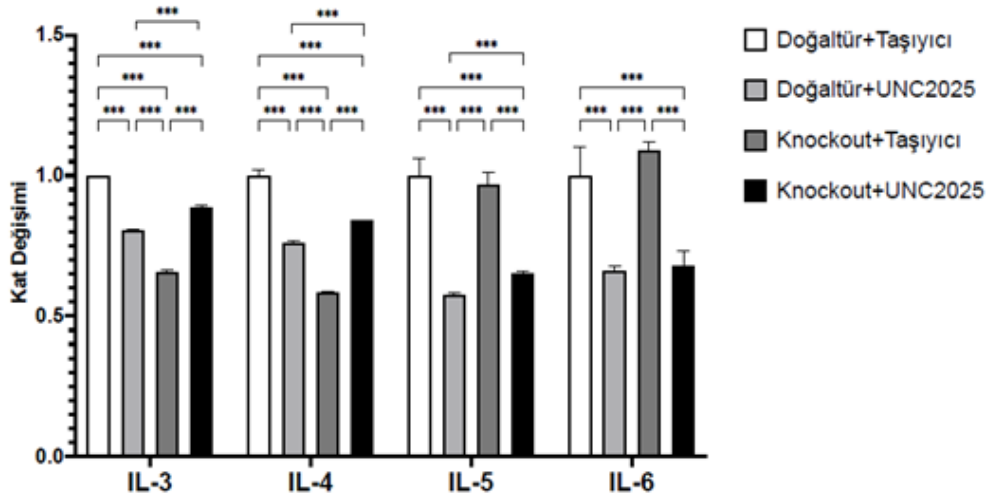
grubunda istatistiksel olarak anlamlı olan bir artış görülmektedir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta RANTES seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan derecede azaldığı görülmüştür. Stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1 / CXCL12) pro-inflamatuar bir kemokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki SDF-1 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görülmektedir. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta MIP-2 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Şekil 6.4.6.).



Şekil 6.4.7. IL-1α, IL-1β, IL-1ra ve IL-2 analizi. Veri ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

İnterlökin-1α (IL-1α) ve β (IL-1β) IL-1 ailesinin majör proinflamatuvar sitokinleridir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-1α seviyelerinde, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüş, Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 gruplarında ise istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir. Knockout gruplarda ise taşıyıcı uygulaması yapılan grup ile UNC2025 uygulaması yapılan grup arasında bir farklılık görülmemiştir. IL-1β seviyeleri için ise, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla,

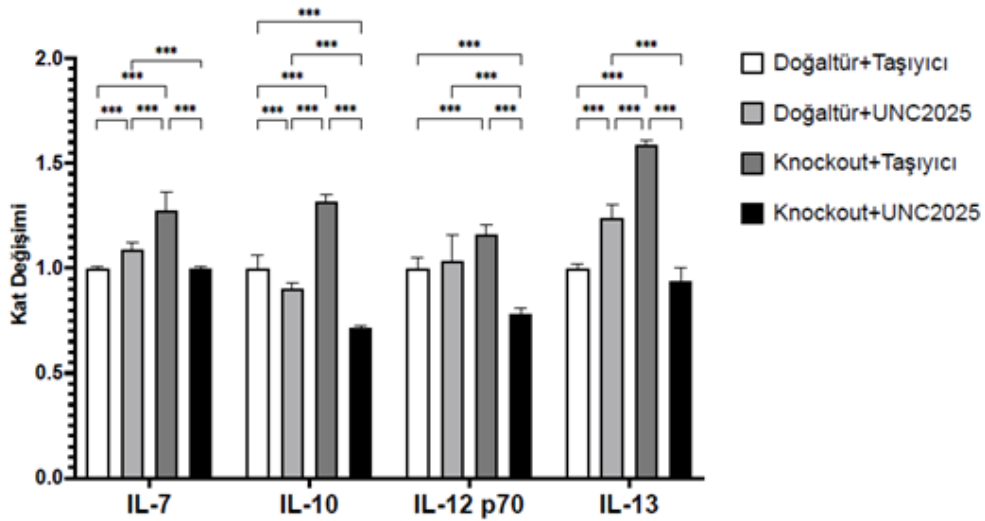
Doğaltür+UNC2025 ve Knockout+Taşıyıcı gruplarında anlamlı bir artış, Knockout+UNC2025 grubunda ise anlamlı bir azalış görülmüştür. Knockout+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Knockout+UNC2025 grubunda anlamlı bir azalış bulunmuştur. IL-1Ra, İnterlökin-1 reseptörünün endojen antagonistidir ve IL-1 üretimine neden olan aynı uyaranlara cevap olarak üretilir. IL-1Ra seviyelerinde, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda anlamlı bir artış görülmüşken, Knockout+UNC2025 grubunda anlamlı bir azalış vardı Doğaltür+Taşıyıcı, Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 grupları arasında bir farklılık yoktu. IL-2 lenfosit fonksiyonları için gerekli immünoregülatör bir sitokindir. IL-2 seviyeleri Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda anlamlı olarak artmışken, Knockout+UNC2025 grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Doğaltür+Taşıyıcı grubu ile Knockout+Taşıyıcı grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Knockout+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Knockout+UNC2025 grubunda IL-2 seviyelerini anlamlı şekilde düşüktü (Şekil 6.4.7).



**Şekil 6.4.8.** IL-3, IL-4, IL-5 ve IL-6 sitokinlerinin analizi (n=4/ grup). Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Çoklu koloni stimüle edici faktör olarak da bilinen IL-3, farklı hematopoetik hatların gelişimini uyaran bir sitokindir. IL-3 seviyeleri Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, diğer 3 grupta daha düşüktü. Knockout+Taşıyıcı grubuna kıyasla Knockout+UNC2025 grubunda IL-3 seviyeleri anlamlı seviyede yüksek bulundu.

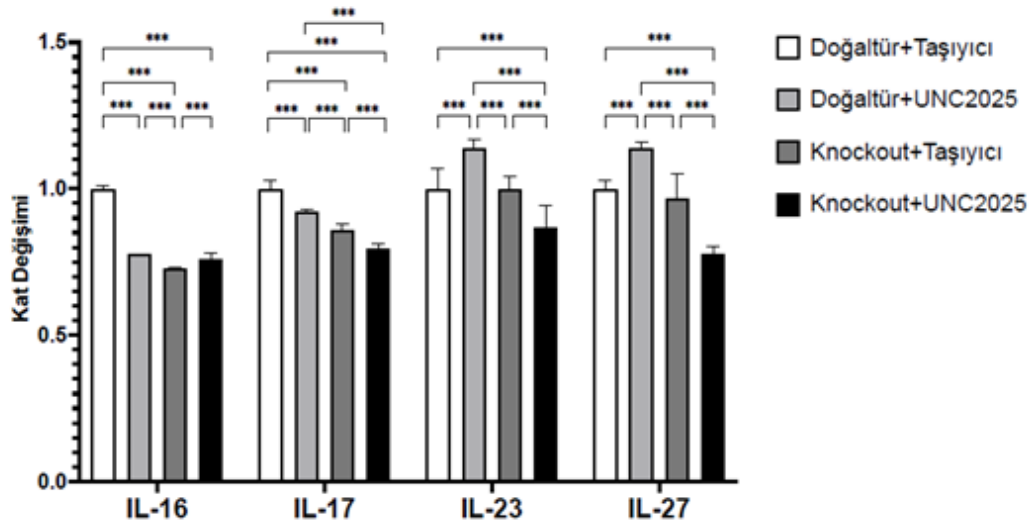
Büyük ölçüde bazofiller tarafından üretilen IL-4, B hücrelerinden IgE üretimini uyaran bir sitokindir. IL-4 seviyeleri, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, diğer 3 grupta daha düşüktü. Knockout+Taşıyıcı grubuna kıyasla Knockout+UNC2025 grubunda IL-4 seviyeleri anlamlı seviyede yüksek bulundu. IL-5 eozinofillerin ve B hücrelerinin gelişimini uyaran ve ayrıca alerjik reaksiyonlardan sorumlu bir sitokindir. IL-5 seviyeleri, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 ve Knockout+UNC2025 gruplarında daha düşüktü. Knockout+Taşıyıcı grubunda ise Knockout+UNC2025 grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu. IL-6 akut-faz cevabının oluşmasından sorumlu anti-inflamatuvar bir sitokindir. IL-6 seviyeleri, Doğaltür+Taşıyıcı grubunda, Doğaltür+UNC2025 ve Knockout+UNC2025 gruplarında anlamlı seviyede düşük bulundu. Knockout+Taşıyıcı grubunda IL-6 seviyeleri Knockout+UNC2025 grubundan anlamlı seviyede düşüktü (Şekil 6.4.8.).



**Şekil 6.4.9.** IL-7, IL-10, IL-12p70 ve IL-13 sitokinlerinin analizi (n=4/ grup). Veri ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

IL-7, bağışıklık sistemi hücrelerinin gelişiminde ve yenilenmesinde önemli bir rol oynayan bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-7 seviyelerinde bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış, Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür. IL-10, inflamasyonu azaltan ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde

etkili olan bir sitokindir. Ayrıca nöroprotektif olarak rol almaktadır. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-10 seviyelerinde bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış, Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür. IL-12 p70, T hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olup, bağışıklık sisteminin savunma yanıtlarının düzenlenmesinde ve enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir rol oynar. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-12 p70 seviyelerinde bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür. IL-13, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olup, inflamasyonu azaltma ve dokuların yenilenmesinde etkilidir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-13 seviyelerinde bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış, Knockout+Taşıyıcı ve Knockout+UNC2025 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür (Şekil 6.4.9).



**Şekil 6.4.10.** IL-16, IL-17, IL-23 ve IL-27 sitokinlerinin analizi (n=4/ grup). Veri ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. \*p<0.05/ \*\*p<0.01/ \*\*\*p<0.001 istatistiksel farklılığı göstermektedir.

IL-16 pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-16 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla,

Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IL-16 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür. IL-17 pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-17 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IL-17 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. IL-23 pro-inflamatuar bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-23 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IL-23 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. IL-27 hem pro- hem de anti-inflamatuar etkileri olan bir sitokindir. Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki IL-27 seviyelerine bakıldığında, Doğaltür+Taşıyıcı grubuna kıyasla, Doğaltür+UNC2025 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Knockout gruplarında ise, taşıyıcı grubuna kıyasla UNC2025 verilen grupta IL-27 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (**Şekil 6.4.10.**).

## 7. TARTIŞMA

Oksijen yoksunluğu nedeniyle ölümden zihinsel ve motor bozukluğa kadar kalıcı hasara sebep olabilen YHİ, perinatal morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. YHİ'nin patofizyolojik süreçleri, hipoksik doku iltihabı, nöronal eksitotoksisite, hücre apoptozu ve mikroglial aktivasyon olduğu bilinmektedir. Yenidoğanın farklı fizyolojik telafi edici mekanizmaları olmasına rağmen, 2015 yılında mortalite insidansının her 1000 canlı doğumda 8'e kadar ulaştığı belirtilmiştir [8]. Uzun vadede geri dönüşü olmayan sonuçların engellenmesi amacıyla bu patofizyolojik süreçleri ve altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak büyük önem taşır.

MerTK'in beyindeki apoptotik hücrelerin fagositozunda, mikroglia gibi immün hücrelerinin aktivasyonunda ve zararlı metabolitlerin uzaklaştırılmasında rol oynadığı bilinmesine rağmen YHİ sonrası patofizyolojik süreçleri hakkındaki bilgiler yetersizdir. MerTK'nin etkilerini anlamaya yönelik geliştirilen inhibitörler olsa da literatürdeki çalışmalar kanser üzerine yoğunlaşmaktadır. Buna bağlı olarak, MerTK'nin nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar çok sınırlıdır.

MerTK'nin özellikle beyin hasarından sonraki subakut fazda artan ifadesi, YHİ sonrasında ortaya çıkan semptomların ve dejeneratif süreçlerin beyinde yeniden şekillenmesinde önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışma kapsamında, YHİ sonrası akut dejeneratif süreçleri incelemek amacıyla hücresel sağkalım ve apoptoz gibi hücre ölümü süreçlerinin analizi yapılmıştır. Ayrıca, enflamatuar süreçlerin araştırılması için planar surface immunohistokimya yöntemi uygulanmıştır. Olası genetik modifikasyonların sonuçlar üzerindeki etkilerini en aza indirmek amacıyla MerTK knockout farelere ek olarak spesifik inhibitörü olan UNC2025 kullanılmıştır. Bu sayede, MerTK ifadesini değiştirmenin, hayvandaki diğer gen ekspresyonlarını etkilemediğine emin olunmak istenmiştir.

Bu bağlamda, Hİ sonrasında kuru buz üzerinde dondurulup cryostat cihazıyla 1 mm aralıklarla alınan kesitlere beyin hacmi, atrofi ve hasar hacmi analizleri yapılabilmesi amacıyla cresyl violet boyaması gerçekleştirilmiştir [103]. Hem

doğaltür hem de knockout gruplarında MerTK inhibisyonun beyin hacmini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği tespit edilmiştir. Beyin hacmindeki değişim genellikle KBB'nin bozulması sonucu beyin parankimine kontrolsüz şekilde giren iyonların beyindeki iyon konsantrasyonu dengesini bozması ve bu şekilde doku içerisinde ödem meydana gelmesiyle oluşabileceği düşünülmektedir.

Beyin hacminin bölgesel olarak etkisinin analiz edilmesi amacıyla striatum, korpus kallozum ve hipokampus alanları ayrı ayrı incelenmiştir. Striatum hedefe yönelik hareket, ödül ve karar verme gibi birçok önemli işleve hizmet eder [104]. UNC2025 uygulaması sonucu MerTK inhibisyonun doğaltür ve knockout farelerde belirli bir derecede striatumun hacmini arttırdığını fakat gruplar arası yapılan istatistiksel analizler bu artışın anlamlı bir ifade olmadığını göstermiştir. Bir diğer yandan, iki serebral hemisfer arasındaki bilgi alışverişini sağlayan korpus kallozum hacimleri analiz edildiğinde doğaltür ve knockout gruplarında anlamlı bir değişim görülmemiştir [105]. Serebral korteksin bir uzantısı olan hipokampus öğrenme, hafıza ve konumsal navigasyonun düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Hassas ve plastik yapısı sebebiyle çeşitli uyarılar tarafından zarar görmeye daha yatkındır [106]. Aynı zamanda hasar durumunda ve Alzheimer gibi hastalıklarda prognostik bir belirteç olarak kabul edilir [107]. Hipokampus hacimleri analiz edildiğinde ise doğaltür ve knockout farelerde MerTK inhibisyonunun hipokampus hacmini istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı belirlenmiştir.

YHİ sonrasında fizyolojik fonksiyonlarının işlevselliğinin sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. Yapılan analizlerde, doğaltür hayvanlardaki atrofi seviyesinin MerTK inhibisyonu sonucunda azaldığı belirlenmiştir. Ancak burada saptanan azalma trendinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Knockout hayvanlardaki MerTK inhibisyonun da benzer olarak atrofiyi azalttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar MerTK inhibisyonunun hasar sonrası doku bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunduğunu ifade etmektedir.

Hasar hacmi YHİ sonrasında hasar büyüklüğünü doğrudan gösteren, tanısal ve prognostik süreçlerde de önem arz eden bir parametredir. MerTK inhibisyonu

yapılan doğaltür grubunun, taşıyıcı uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, MerTK knockout hayvanlarda inhibisyon uygulanan grubun taşıyıcı uygulanan gruba kıyasla hasar hacminde bir azalma trendi görülmüştür ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı seviyede bulunmamaktadır.

Nöronal sağkalım analizinde, doğaltür ve knockout hayvanların Neun(+) hücre sayısı kıyaslandığında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Hİ sonrası MerTK'nın nöronal sağkalıma etkisi araştırılmak amacıyla UNC2025 uygulaması yapılan gruplar analiz edilmiştir. Doğaltür farelerde MerTK inhibisyonunun nöronal sağkalımı istatistiksel olarak artırırken, knockout farelerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Buna bağlı olarak, MerTK'nın YHİ sonrası nöronal sağkalımı artırıcı yönde etkisinin olduğu görülmüştür.

YHİ sonrası beyindeki hücreler, özellikle nöronlar, enerji yetersizliğine bağlı olarak oksidatif stres veya apoptoz gibi hasar mekanizmalarıyla karşı karşıya kalır. İşlev göremeyecek seviyede hasar alan hücreler, DNA fragmantasyonu ile karakterize edilen apoptotik süreçler sonucunda ortadan kaldırılır. Yapılan DNA fragmantasyonu analizinde ise hem doğaltür hem de knockout gruplarında MerTK inhibisyonunun TUNEL(+) hücre sayısını istatistiksel olarak arttırdığı gözlenmiştir. MerTK'nın normal fizyolojik koşullarda özellikle MAPK veya PI3K/Akt gibi anti-apoptotik yolları indükleyebilir ve efferositoz sürecinde aktif bir rolü olduğu bilinmektedir. Apoptotik hücre sayısındaki bu artış, MerTK inhibisyonu sonucu bu mekanizmaların işlevsel olarak çalışmamasından kaynaklandığı düşünölmektedir. MerTK inhibisyonunun YHİ sürecindeki sonuçlarını aydınlatmak aynı zamanda beyin yeniden şekillenmesi, doku homeostazı, apoptotik ve enflamatuar süreçler üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

## 8. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, MerTK'nın inhibisyonunun akut yenidoğan hipoksi iskemisi üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, MerTK knockout farelerin kullanılmasına ek olarak muhtemel genetik değişikliklerin bulguları etkilemesini engellemek için spesifik MerTK inhibitörü UNC2025'de oral gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, MerTK'nın inflamasyonda görevli olan birçok kemokin ve sitokini YHİ sonrasında değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, MerTK inhibisyonun hasar hacmi, nöronal sağkalım ve DNA fragmantasyonunda doğrudan bir etkisi olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, MerTK'nın YHİ sonrası apoptotik hücrelerin temizlenmesinde etkisi olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler MerTK'nın YHİ patofizyolojisindeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacıyla daha detaylı moleküler çalışmalarla aşağı yönlü yolakların da araştırılması gerektiğini göstermektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Mir, I.N. and L.F. Chalak, *Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit*. Early human development, 2014. **90**(10): p. 707-711.
2. Vannucci, S.J. and H. Hagberg, *Hypoxia-ischemia in the immature brain*. J Exp Biol, 2004. **207**(Pt 18): p. 3149-54.
3. Johnson, K. and R. Ji, *TAM receptors: two pathways to regulate adult neurogenesis*. Neural Regen Res, 2015. **10**(3): p. 344-5.
4. Ji, R., et al., *TAM receptors support neural stem cell survival, proliferation and neuronal differentiation*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115140.
5. Rink, C. and S. Khanna, *Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(10): p. 1889-903.
6. Siegel, G.J. and R.W. Albers, *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. 1994: Raven Press.
7. Grow, J. and J.D. Barks, *Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts*. Clinics in perinatology, 2002. **29**(4): p. 585-602.
8. Douglas-Escobar, M. and M.D. Weiss, *Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician*. JAMA pediatrics, 2015. **169**(4): p. 397-403.
9. Lee, A.C., et al., *Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990*. Pediatric research, 2013. **74**(1): p. 50-72.
10. Fatemi, A., M.A. Wilson, and M.V. Johnston, *Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant*. Clinics in perinatology, 2009. **36**(4): p. 835-858.
11. Tarkowska, A., *Hypoxic-Ischemic Brain Injury after Perinatal Asphyxia as a Possible Factor in the Pathology of Alzheimer's Disease*. Exon Publications, 2021: p. 45-59.
12. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends in neurosciences, 1999. **22**(9): p. 391-397.
13. Suzuki, M., et al., *Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats*. Japanese journal of pharmacology, 2001. **87**(2): p. 143-150.
14. Prins, M.L., *Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2008. **28**(1): p. 1-16.
15. Magistretti, P.J. and I. Allaman, *Brain energy metabolism*. Fundamental neuroscience, 1999. **3**: p. 271-293.
16. Dwyer, D., Vannucci SJ, and Simpson IA. Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. Int Rev Neurobiol, 2002. **51**: p. 159-188.
17. Morris, M.E. and M.A. Felmler, *Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse  $\gamma$ -hydroxybutyric acid*. The AAPS journal, 2008. **10**: p. 311-321.

18. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2010. **298**(2): p. E141-E145.
19. Vannucci, S.J. and I.A. Simpson, *Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(5): p. E1127-34.
20. Nehlig, A., S. Boyet, and A.P. de Vasconcelos, *Autoradiographic measurement of local cerebral  $\beta$ -hydroxybutyrate uptake in the rat during postnatal development*. Neuroscience, 1991. **40**(3): p. 871-878.
21. McQuillen, P.S., S.J. Vannucci, and H. Hagberg, *Pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury*, in *Fetal and Neonatal Physiology*. 2017, Elsevier. p. 1686-1695. e4.
22. Vannucci, S.J., *Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain*. Journal of neurochemistry, 1994. **62**(1): p. 240-246.
23. Deutch, A.Y. and R.H. Roth, *Neurotransmitters*. 1999.
24. Magistretti, P.J., et al., *Energy on demand*. Science, 1999. **283**(5401): p. 496-497.
25. Blomgren, K. and H. Hagberg, *Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain*. Free radical biology and medicine, 2006. **40**(3): p. 388-397.
26. Salter, M.G. and R. Fern, *NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1167-1171.
27. Marret, S., et al., *Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1995. **54**(3): p. 358-370.
28. Johnston, M.V., *Excitotoxicity in perinatal brain injury*. Brain Pathol, 2005. **15**(3): p. 234-40.
29. Wu, Q.J. and M. Tymianski, *Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection*. Molecular brain, 2018. **11**: p. 1-14.
30. Kristián, T. and B.K. Siesjö, *Calcium in ischemic cell death*. Stroke, 1998. **29**(3): p. 705-718.
31. Xu, J., et al., *Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP*. Journal of Neuroscience, 2009. **29**(29): p. 9330-9343.
32. Bano, D., et al., *Cleavage of the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in excitotoxicity*. Cell, 2005. **120**(2): p. 275-285.
33. Chen, X.-m., et al., *Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury*. Acta Pharmacologica Sinica, 2013. **34**(1): p. 67-77.
34. Nicolescu, A.C., et al., *Inhibition of lipid peroxidation in synaptosomes and liposomes by nitrates and nitrites*. Chemical research in toxicology, 2002. **15**(7): p. 985-998.
35. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(42): p. 26066-26075.

36. Ferriero, D.M., et al., *Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic–ischemic injury*. *Neurobiology of disease*, 1996. **3**(1): p. 64-71.
37. Johnston, M.V., W. Nakajima, and H. Hagberg, *Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain*. *The Neuroscientist*, 2002. **8**(3): p. 212-220.
38. Green, D.R. and F. Llambi, *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(12).
39. Zhang, Y., et al., *Plasma membrane changes during programmed cell deaths*. *Cell Research*, 2018. **28**(1): p. 9-21.
40. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. *British journal of cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-257.
41. Leist, M. and M. Jäätelä, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(8): p. 589-98.
42. Blomgren, K., et al., *Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"?* *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10191-8.
43. Danial, N.N., *BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(24): p. 7254-7263.
44. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. *Biochem J*, 1997. **326** (Pt 1)(Pt 1): p. 1-16.
45. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-776.
46. Zhu, C., et al., *Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain*. *J Neurochem*, 2003. **86**(2): p. 306-17.
47. Cheng, Y., et al., *Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(9): p. 1992-9.
48. Wang, X., et al., *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia*. *Neurobiol Dis*, 2004. **16**(1): p. 179-89.
49. Yenari, M.A., T.M. Kauppinen, and R.A. Swanson, *Microglial activation in stroke: therapeutic targets*. *Neurotherapeutics*, 2010. **7**(4): p. 378-91.
50. Iadecola, C. and J. Anrather, *The immunology of stroke: from mechanisms to translation*. *Nat Med*, 2011. **17**(7): p. 796-808.
51. Liu, F. and L.D. McCullough, *Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy*. *Acta Pharmacol Sin*, 2013. **34**(9): p. 1121-30.
52. Algra, S.O., et al., *Cerebral ischemia initiates an immediate innate immune response in neonates during cardiac surgery*. *J Neuroinflammation*, 2013. **10**: p. 24.
53. Tuttolomondo, A., et al., *Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(33): p. 3574-89.
54. Hu, X., et al., *Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia*. *Stroke*, 2012. **43**(11): p. 3063-70.

55. Cowell, R.M., et al., *Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain*. *Stroke*, 2002. **33**(3): p. 795-801.
56. Kaur, C., G. Rathnasamy, and E.A. Ling, *Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013. **8**(1): p. 66-78.
57. Chhor, V., et al., *Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro*. *Brain Behav Immun*, 2013. **32**: p. 70-85.
58. Gomes-Leal, W., *Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders?* *Brain Behav*, 2012. **2**(3): p. 345-56.
59. Faustino, J.V., et al., *Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke*. *J Neurosci*, 2011. **31**(36): p. 12992-3001.
60. Mildner, A., et al., *Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(12): p. 1544-53.
61. Varvel, N.H., et al., *Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(44): p. 18150-5.
62. Roessmann, U. and P. Gambetti, *Pathological reaction of astrocytes in perinatal brain injury. Immunohistochemical study*. *Acta Neuropathol*, 1986. **70**(3-4): p. 302-7.
63. Derugin, N., et al., *Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats*. *Stroke*, 2000. **31**(7): p. 1752-61.
64. Lau, L.T. and A.C. Yu, *Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury*. *J Neurotrauma*, 2001. **18**(3): p. 351-9.
65. Liu, J. and Z.C. Feng, *Increased umbilical cord plasma interleukin-1 beta levels was correlated with adverse outcomes of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy*. *J Trop Pediatr*, 2010. **56**(3): p. 178-82.
66. Hedtjörn, M., et al., *Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury*. *J Neurosci*, 2002. **22**(14): p. 5910-9.
67. Liu, X.H., et al., *The platelet-activating factor antagonist BN 52021 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in the immature rat*. *Pediatr Res*, 1996. **40**(6): p. 797-803.
68. Hagberg, H., et al., *Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats*. *Pediatr Res*, 1996. **40**(4): p. 603-9.
69. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
70. Zhang, J. and X. Qi, *The role of the TAM family of receptor tyrosine kinases in neural development and disorders*. *Neuropsychiatry*, 2018. **8**(2): p. 428-437.
71. Linger, R.M., et al., *TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer*. *Adv Cancer Res*, 2008. **100**: p. 35-83.

72. Robinson, D.R., Y.-M. Wu, and S.-F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5548-5557.
73. Pierce, A.M. and A.K. Keating, *TAM receptor tyrosine kinases: expression, disease and oncogenesis in the central nervous system*. *Brain research*, 2014. **1542**: p. 206-220.
74. Graham, D.K., et al., *The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2014. **14**(12): p. 769-785.
75. Linger, R.M., et al., *TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer*. *Advances in cancer research*, 2008. **100**: p. 35-83.
76. Tondo, G., D. Perani, and C. Comi, *TAM receptor pathways at the crossroads of neuroinflammation and neurodegeneration*. *Disease Markers*, 2019. **2019**.
77. Yamagata, M., J.R. Sanes, and J.A. Weiner, *Synaptic adhesion molecules*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(5): p. 621-32.
78. Hoehn, H.J., et al., *Axl<sup>-/-</sup> mice have delayed recovery and prolonged axonal damage following cuprizone toxicity*. *Brain Res*, 2008. **1240**: p. 1-11.
79. Hutterer, M., et al., *Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 130-8.
80. Burstyn-Cohen, T. and A. Hochberg, *TAM Signaling in the Nervous System*. *Brain Plast*, 2021. **7**(1): p. 33-46.
81. Binder, M.D. and T.J. Kilpatrick, *TAM receptor signalling and demyelination*. *Neurosignals*, 2009. **17**(4): p. 277-287.
82. Zhao, Q., et al., *Expression and localization of receptor tyrosine kinase Tyro3 in rat brain*. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Peking University. Health Sciences*, 2012. **44**(6): p. 905-910.
83. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*. *Nature medicine*, 2001. **7**(2): p. 215-221.
84. Miyamoto, Y., et al., *Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination*. *Molecular biology of the cell*, 2015. **26**(19): p. 3489-3503.
85. Prieto, A.L., J.L. Weber, and C. Lai, *Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system*. *Journal of comparative neurology*, 2000. **425**(2): p. 295-314.
86. Cahoy, J.D., et al., *A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function*. *Journal of Neuroscience*, 2008. **28**(1): p. 264-278.
87. Fourgeaud, L., et al., *TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology*. *Nature*, 2016. **532**(7598): p. 240-244.
88. Schoumacher, M. and M. Burbidge, *Key roles of AXL and MER receptor tyrosine kinases in resistance to multiple anticancer therapies*. *Current oncology reports*, 2017. **19**: p. 1-14.
89. Behrens, E.M., et al., *The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity*. *European journal of immunology*, 2003. **33**(8): p. 2160-2167.

90. Tufail, Y., et al., *Phosphatidylserine exposure controls viral innate immune responses by microglia*. *Neuron*, 2017. **93**(3): p. 574-586. e8.
91. Thorp, E., et al., *Mertk receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe<sup>-/-</sup> mice*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2008. **28**(8): p. 1421-1428.
92. Damisah, E.C., et al., *Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo*. *Sci Adv*, 2020. **6**(26): p. eaba3239.
93. Lemke, G., *Biology of the TAM receptors*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(11): p. a009076.
94. Seitz, H.M., et al., *Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5635-42.
95. Ballantine, L., et al., *Increased soluble phagocytic receptors sMer, sTyro3 and sAxl and reduced phagocytosis in juvenile-onset systemic lupus erythematosus*. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2015. **13**: p. 10.
96. Recarte-Pelz, P., et al., *Vitamin K-dependent proteins GAS6 and Protein S and TAM receptors in patients of systemic lupus erythematosus: correlation with common genetic variants and disease activity*. *Arthritis Res Ther*, 2013. **15**(2): p. R41.
97. Healy, L.M., et al., *MerTK is a functional regulator of myelin phagocytosis by human myeloid cells*. *The Journal of Immunology*, 2016. **196**(8): p. 3375-3384.
98. Brosius Lutz, A., et al., *Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(38): p. E8072-E8080.
99. Kotter, M.R., et al., *Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation*. *J Neurosci*, 2006. **26**(1): p. 328-32.
100. Lemke, G. and C.V. Rothlin, *Immunobiology of the TAM receptors*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 327-36.
101. Zhang, W., et al., *UNC2025, a potent and orally bioavailable MER/FLT3 dual inhibitor*. *Journal of medicinal chemistry*, 2014. **57**(16): p. 7031-7041.
102. Butchbach, M.E., et al., *A novel method for oral delivery of drug compounds to the neonatal SMNDelta7 mouse model of spinal muscular atrophy*. *J Neurosci Methods*, 2007. **161**(2): p. 285-90.
103. Beker, M.C., et al., *Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(3): p. 2565-2576.
104. Báez-Mendoza, R. and W. Schultz, *The role of the striatum in social behavior*. *Frontiers in Neuroscience*, 2013. **7**.
105. Eccher, M., *Corpus Callosum*, in *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*, M.J. Aminoff and R.B. Daroff, Editors. 2014, Academic Press: Oxford. p. 867-868.
106. Anand, K.S. and V. Dhikav, *Hippocampus in health and disease: An overview*. *Ann Indian Acad Neurol*, 2012. **15**(4): p. 239-46.

107. Dhikav, V. and K.S. Anand, *Glucocorticoids may initiate Alzheimer's disease: a potential therapeutic role for mifepristone (RU-486)*. *Med Hypotheses*, 2007. **68**(5): p. 1088-92.



## 10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
31/01/2023	09		Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

"Mer Tirozin Kinaz'ın Yenidoğan Hipoksi İskemi Modelinde Akut Dönem Etkilerinin Araştırılması" 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	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Doç. Dr. İlknur KESKİN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Neşe AYSİT	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Nilay ATEŞ	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	