



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİPOTALAMİK TERMOREGÜLASYONUN İSKEMİK HASAR
ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

AYŞENUR ÖZPINAR

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 : Ayşenur Özpınar
Tez Başlığı : Hipotalamik Termoregülasyonun İskemik Hasar Üzerindeki
Nöroprotektif Etkisi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi

Sınav Tarihi : 26.07.2023

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. Üye. Mustafa Çağlar BEKER

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye Nilay ATEŞ

İstanbul Medipol Üniversitesi

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

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

Ayşenur ÖZPINAR

İTHAF

*“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bana rehberlik eden, destekleyen, yeni vizyon ve fikirler katan danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en içten sevgi ve saygımı sunuyorum.

Her sorunumda yanına gittiğim ve her zaman çözümleriyle beni rahatlatan, bilgi ve deneyimleriyle yoluma rehberlik eden Dr. Öğr. Üye. Mustafa Çağlar BEKER hocama teşekkürlerimi sunarım.

Bana hem abla hem de harika bir hoca olarak iyi kötü her günümde yanımda olan sevgili hocam Dr. Öğr. Üye. Pelin DİLSİZ ERİM'e teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek derslerin gerek deneylerin ve karşılaştığım bütün zorlukların altından beraber kalktığım yoldaşım Buse BALABAN'a teşekkür ediyorum.

Laboratuvarı zevkli kılan, omuz omuza verip çalıştığım 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 ve benden sonsuz desteğini esirgemeyen Dr. Serdar ALTUNAY'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yürüdüğüm her yolda sırtımı yasladığım annem Şaduman ÖZPINAR'a ve babam Sami ÖZPINAR'a, küçüklüğümde beri bana rol model olan ablam Beyza ÖZPINAR'a en derin minnettarlığımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Serebral İskeminin Patofizyolojisi.....	5
4.1.1. Yayılan depolarizasyon	6
4.1.2. Eksitotoksisite.....	6
4.1.3. Oksidatif stres	7
4.1.4. İnflamasyon	8
4.2. Termoregülasyon	10
4.3. Kahverengi Yağ Dokusu (BAT).....	13
4.4. Termoregülasyon ve Serebral İskemi	14
5. MATERYAL METOT	17
5.1. Deney Planı ve Deney Grupları.....	17
5.2. İntrakraniyal Anterograd Floresan Boncuk Enjeksiyonu	18
5.3. Rekombinant Adeno-asosiye Virüs Üretimi.....	19
5.3.1. Plazmit DNA'nın çoğaltılması	19
5.3.2. DNA izolasyonu	20
5.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu	21
5.3.4. Pürifikasyon.....	21
5.4. Deney Hayvanı Çalışmaları.....	22
5.4.1. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu	22

5.4.2. Vücut sıcaklığını değerlendirme ve açık alan testi	25
5.4.3. Serebral iskemi modelinin uygulanması.....	25
5.4.4. Lazer Speckle görüntüleme tekniği	27
5.4.5. Nörolojik skora	29
5.5. Beyinden Örnek Alınması	29
5.6. Cresyl Violet Boyaması.....	30
5.7. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İmmunoglobulin G Boyamasıyla İncelenmesi.....	31
5.8. İn-sitü Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile DNA Kırıklarının Belirlenmesi	31
5.9. NeUN Boyaması ile Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi	32
5.10. İstatistiksel Analizler	33
6. BULGULAR	34
6.1. DMH Nöronlarında Transgen İfadesi.....	34
6.1.1. DMH nöronlarında hM4Dq-mCherry transgen ifadesi	34
6.1.2. DMH ^{Vgat2} nöronlarının termoregülasyonu üzerindeki etkisi ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi	35
6.2. Nörolojik Hasar Skoru.....	37
6.3. Hasar Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi	38
6.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi.....	40
6.5. DNA Fragmentasyonu Analizi	40
6.6. Nöronal Sağkalım Analizi	41
6.7. İskemik Kor, Penumbra ve Hasarsız Korteks Bölgesindeki Kan Akımı.....	43
7. TARTIŞMA.....	45
8. SONUÇ	51
9. KAYNAKLAR.....	52
10. ETİK KURUL ONAYI	60
11. ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CLZ	Klozapin
DMH	Dorsomedial Hipotalamus
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GFAP	Glial fibriler asidik protein
IgG	Immunoglobulin G
KBB	Kan beyin bariyeri
LDF	Laser Doppler akışmetre
LSI	Laser Speckle görüntüleme
MCAO	Orta serebral arter oklüzyonu
NMDA	N-metil-D-aspartat
NRD	Nucleus raphe dorsalis
NRP	Nucleus raphe pallidus
POA	Preoptik Alan
rAAV	Rekombinant Adeno Asosiye Virüs
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rtPA	Rekombinant Doku Plazminojen Aktivatörü
SD	Yayılan depolarizasyon
TH	Terapötik hipotermi
Vgat	Vesicular GABA transporter
VLPO	Ventrolateral preoptic area

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 5.1.1. Deney dizaynı	18
Şekil 5.4.1.1. Beyin içi enjeksiyon düzeneği	24
Şekil 5.4.2.1. Operasyonel deney dizaynı	27
Şekil 5.4.3.1. Lazer Speckle cihazı	28
Şekil 5.5.1. Cryostat cihazı.....	30
Şekil 6.1.1.1. DMH nöronlarında hM4Dq-mCherry ve GFP transgen ifadesinin gösterilmesi.....	34
Şekil 6.1.2.1. DMH ^{Vgat2} nöron inhibisyonunun termoregülasyon üzerine olan etkisinin gösterilmesi.....	35
Şekil 6.1.2.2. DMH ^{Vgat2} nöron inhibisyonunun lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin gösterilmesi.....	36
Şekil 6.2.1. Nörolojik hasar skorlaması	37
Şekil 6.3.1. Beyindeki hasar hacmi analizi	38
Şekil 6.3.2. Beyindeki ödem hacmi analizi.....	39
Şekil 6.4.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi	40
Şekil 6.5.1. TUNEL boyaması ile apoptotik hücre değerlendirilmesi	41
Şekil 6.6.1. Nöronal sağkalımın NeUN boyaması ile değerlendirilmesi	42
Şekil 6.7.1. İskemik kor bölgesindeki kan akımının analizi	43
Şekil 6.7.2. Penumbra bölgesindeki kan akımının analizi	44
Şekil 6.7.3. Hasarsız korteks bölgesindeki kan akımının analizi	44

1. ÖZET

HİPOTALAMİK TERMOREGÜLASYONUN İSKEMİK HASAR ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Akut iskemik inme, dünya çapındaki inmelerin yaklaşık %85' inin birincil nedenidir. Yapılan araştırmalar hastaneye yatış ile ilk müdahale arasında geçen sürenin olabildiğince az olmasının eldeki tedavi yöntemlerinde başarı oranını arttıracakını göstermiştir. Ancak kısıtlı tedavilerdeki limitasyonlar sebebi ile inme için alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması devam etmektedir. Terapötik hipotermi, alternatif tedavi için güçlü bir yaklaşım olarak görülmektedir. Terapötik hipoterminin serebral iskemide protektif etkinliği deneysel modellerde kabul edilmektedir. Yapılan klinik çalışmalar insanlarda da iyileştirici sonuçlar doğurduğunu göstermektedir. Bu tez kapsamında hipotermiyi indüklemek üzere DMH^{Vgat2} nöronlarının manipülasyonu kemogenetik yaklaşım ile sağlandı. Beyin hasarı modellemesinin ardından elde edilen beyin dokularından hasar hacmi, beyin ödemi, kan beyin bariyeri geçirgenliği, nöronal sağkalım, apoptotik hücre ölümü ve serebral kan dolaşımı araştırmaları yapıldı. Kemogenetik yöntemle hipotermi indüklenen DIO-hM4D grubu hayvanlarda, DIO-GFP grubundaki hayvanlara kıyasla, hasar hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliği ve apoptotik hücre sayısının azaldığı, nöronal sağkalımın ise arttığı gözlemlendi. Bu bulgular, DMH^{Vgat2} nöronlarının kemogenetik inhibisyonunun farelerin vücut sıcaklığını düşürdüğünü ve bu sayede akut iskemi için tedavi edici etkilerinin olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Akut inme, Dorsomedial Hipotalamus, Kemogenetik, Terapötik hipotermi

2. ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF HYPOTHALAMIC THERMOREGULATION ON ISCHEMIC INJURY

Acute ischemic stroke is the primary cause of approximately 85% of strokes worldwide and the previous studies demonstrated that minimizing the time between the hospitalization and the first intervention increases the success rate of available treatment modalities. However, due to the limitations of the current treatment options, the search for alternative treatment modalities for stroke continues. Therapeutic hypothermia has been defined as a critical approach for an alternative treatment. The prophylactic efficacy of therapeutic hypothermia in cerebral ischemia has been acknowledged in the experimental models. The clinical studies demonstrate that it also leads to ameliorative results in humans. In this thesis, manipulation of DMH^{Vgat2} neurons to induce hypothermia has been achieved by the chemogenetic approach. Following brain injury modeling, brain tissues were used to investigate the infarct volume, brain edema, blood brain barrier permeability, neuronal survival, apoptotic cell death and cerebral blood circulation. Compared to DIO-GFP group, DIO-hM4D group animals in which hypothermia was induced by the chemogenetic methods, the infarct volume, brain edema, blood brain barrier permeability and the number of apoptotic cells decreased, whereas neuronal survival increased. These findings demonstrated that chemogenetic inhibition of DMH^{Vgat2} neurons decreased the body temperature of mice, which in turn initiated therapeutic activity against acute ischemia.

Keywords: Acute stroke, Chemogenetics, Dorsomedial hypothalamus, Therapeutic hypothermia

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnme, dünya çapında yılda 3 milyondan fazla ölüme neden olan küresel hastalık yükünün en önemli etkenlerinden biridir. Günümüze kadar inmeye karşı çeşitli tedavi yöntemleri ortaya çıkmış, ancak çoğu yetersiz kalmıştır. Bu sebeple, güncel terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Vücut sıcaklığının homeostatik kontrolü memelilerde, insanlar da dahil olmak üzere, hayatta kalmak için gereklidir ve hipotalamustaki sıcaklığa duyarlı nöronlar tarafından düzenlendiği bilinir [1]. Ortam sıcaklığındaki değişiklikler, optimal sıcaklığı korumak amacıyla enerji harcanmasını, termogenezi ve fiziksel aktiviteyi düzenleyen homeostatik tepkileri aktive eder. Vücut ısısının dar bir aralıkta hassas bir şekilde korunması gerekir çünkü bu sıcaklığın sapması hücrel metabolizmayı olumsuz yönde etkileyebilir [2, 3]. Vücut sıcaklığının düzenlenmesine afferent ve efferent olmak üzere iki mekanizma aracılık eder [4]. Afferent mekanizma, vücuttaki sıcaklığı algılayan reseptörler aracılığıyla çalışır ve vücudun sıcaklığı bu reseptörler tarafından belirlenir. Bir diğer mekanizma olan efferent mekanizmalar, vücudun stabilitesini korumak için sıcaklık değişimlerine yanıt verdiği homeostatik tepkilerdir [5]. Bu mekanizmalar, tamamen vücudu koruma işlevi gören vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonu barındırır.

Terapötik hipotermi indüksiyonu, inme de dahil olmak üzere bazı akut beyin hasarları için acil müdahalelerde kullanılır. Vücut ısısı düzenlenmesinin en önemli modülatörü merkezi sinir sistemidir ve bu sistem aynı zamanda bazı beyin bölgelerindeki nöronal alt popülasyonların terapötik soğutulmasına katkıda bulunur [6]. Termoregülasyon kontrolünün ana merkezi, beyinde bulunan hipotalamustur. Hipotalamusta bulunan termoregülasyon bölgelerinden en önemlisi dorsomedial hipotalamus bölgesidir. Bu bölgede bulunan GABAerjik nöronların inhibisyonu vücut ısısını ve dolayısıyla fiziksel aktiviteyi azaltmakta, aktivasyonu ise termogenez yapmaktadır [7, 8].

Vücut sıcaklığının düşürülmesi, yaralanmalardan sonra dokuları koruduğu için birçok klinik yöne sahiptir. Bu nedenle terapötik soğutma, 25 yaşın üzerindeki her dört yetişkinden birini etkileyen inme dahil, klinik durumlardan sonra nöroproteksiyon için

yaygın olarak kullanılır [9]. Terapötik hipotermi, eksitotoksisite, apoptoz, enflamasyon, kan akışı ve kan-beyin bariyeri bütünlüğü ile ilgili bileşenleri modüle ederek birincil hasarın olumsuz etkilerini azaltır ve beyin hasarındaki ikincil hasarın önüne geçer.

Bu çalışma ile, termoregülasyonda görevli olduğu bilinen dorsomedial hipotalamus bölgesinde var olan GABAerjik nöronlarını kemogenetik yöntemlerle inhibe ederek meydana gelen termoregülatif süreçlerin hem ağır hem de hafif iskemik inme modellerindeki etkilerinin akut dönemde incelenmesi amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Serebral İskeminin Patofizyolojisi

Beyin dokusu canlılığını devam ettirebilmek ve fizyolojik koşullarda çalışmasını sürdürebilmek için yüksek oranda oksijen ve glukoza gereksinim duyar. Beyin iskemisi sonucunda, beyin parankimine yeterli miktarda kanın, dolayısıyla oksijen ve glukozun ulaşamaması nedeniyle enerji bağımlı süreçlerde aksamalar meydana gelir. Buna bağlı olarak nöronların ve gliaların fonksiyonu olumsuz etkilenir ve vasküler bozuklukların beraberinde inflamasyon süreçlerinin oluşmasına neden olur [10]. Beyin parankiminde meydana gelen bu enerji açlığı sonucunda nöronlar transmembran gradiyentlerini koruyamaz ve nöronal sinyalleşmelerde aksamalar meydana gelir. Sürecin devamında ise nöronlarda meydana gelen anoksin depolarizasyonlar sonucu presinaptik uçlardan nörotransmitter salınımları tetiklenir [11]. Sinaptik yarıktaki bu aşırı nörotransmitter artışının temizlenmesi enerji gerektiren bir süreç olması nedeniyle bu tetiklenme sonucu eksitator nörotransmitterlerin konsantrasyonları ekstraselüller alanda artar. Glutamatın neden olduğu bu durum ise eksitotoksisite olarak bilinir.

Ayrıca bu eksitotoksistenin ortaya çıkmasına aracılık eden N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü de önemli bir rol üstlenir. Membranın dinlenme potansiyeli sırasında bu reseptörün kanal kısmı magnezyum ile kapalı halde bulunur. Membranın depolarize olmasıyla birlikte NMDA reseptörü magnezyum blokajından kurtulur ve aktif hale gelerek hücre içine sodyum ve kalsiyum iyonlarının akışına aracılık eder. Bu iyon akışı daha sonrasında intraselüller alandaki depolarda bulunan kalsiyumunda serbestlenmesini beraberinde getirir [12-14]. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasıyla kalsiyuma bağlı nöronal nitrik oksit sentaz gibi süreçler aktive olur. Bu süreç beraberinde serbest radikallerin oluşmasını tetikleyerek apoptozis, nekrozis, ve otofaji gibi hücre ölüm mekanizmalarının oluşmasına aracılık eder. Beyin parankiminde meydana gelen iske mi sonucunda nöronların yanında, diğer merkezi sinir sistemi elemanları olan astrositler, oligodendrositler ve perisitler de etkilenir. Hücre dışı glutamat seviyelerinin artması, postsinaptik alanda [10] hücre içerisine kalsiyum girişini artırmakta ve glial glutamat taşıyıcılarının ekspresyonlarının

azalmasına neden olur. Bu süreçler sonucunda astrositler de reaktif hale gelerek proinflatuar (A1) ya da immünomodülatör (A2) gibi fenotiplere dönüşebilir [15-17]. Reaktif astrogliaz sonucunda nöronal rejenerasyonu engelleyen aynı zamanda da hasarı sınırlandıran bir yapı olan glial skar oluşumu gözlemlenir.

4.1.1. Yayılan depolarizasyon

Serebral iskeminin başlangıcında meydana gelen yayılan depolarizasyon, elektrokimyasal membran yetmezliği ve nöronal ödem oluşumunun ana mekanizmasıdır [18-23]. İskemi gerçekleşikten sonra ilk dakikalarda ATP depolarının tükenmesi sonucu, Na^+/K^+ pompasının çalışmaması sebebiyle iskemik doku boyunca ve çevre dokulara da yayılan bir depolarizasyon meydana gelir [24-28]. Na^+/K^+ ATPaz, hücredeki katyonik iyon gradyanlarını sağlayan ana taşıyıcıdır. Bu pompanın bozulması sonucu yayılan depolarizasyon meydana gelmektedir. Na^+/K^+ ATPaz, ATP harcayarak üç sitozolik sodyumu iki hücre dışı potasyum ile değiştirir. Memelilerde gri maddedeki Na^+/K^+ pompası ATP hidrolizinin yaklaşık %50'sinden sorumludur [29]. İskemi nedeniyle beyin dokusundaki oksijen ve glukoz eksikliği meydana gelir bunun sonucunda da ATP üretimi baskılanır. Bu baskılanma Na^+/K^+ pompasının çalışmamasına, dolayısıyla sodyum ve potasyum akışının bozulmasıyla yayılan depolarizasyona sebep olur [30, 31].

4.1.2. Eksitotoksisite

Eksitator amino asitlerin aşırı derecede ve uzun süreli aktivasyonu sonucu oluşan toksik etkiler eksitotoksisite olarak adlandırılır [32, 33]. Beyin parankiminde baskın olarak bulunan glutamatın aşırı uyarımı sonucu, postsinaptik alandaki iyon kanalları aktive olur ve hücre içerisine kalsiyum akışı gerçekleşir [34]. Hücre içerisinde yüksek kalsiyum birikimi de eksitotoksisiteye neden olan bir dizi olayın oluşumuna aracılık eder [35].

Memeli canlılarda glutamat, esas olarak santral sinir sisteminde nöronal haberleşmeyi sağlar. Glutamat beyinde, presinaptik nöronlardan salınarak postsinaptik nöronlarda etkisini gösterir ve glial hücreler tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Esas olarak astrositlere taşınan glutamat burada glutamin sentetaz yoluyla glutamine dönüştürülür. Ardından glutamin inaktif bir formda glial hücrelerde depolanır ve

mitokondriyal enzim olan fosfata bağımlı glutaminaz yoluyla rejenere edilir. Glutamat yalnız pre ve postsinaptik uçlar arasındaki transmisyonu sağlamaz, aynı zamanda ekstra sinaptik sinyalizasyonda haberleşmenin de gerçekleşmesine aracılık eder [36].

Glutamat reseptörleri, iyonotropik ve metatropik olmak üzere ikiye ayrılır. İyonotropik reseptörler, NMDA, AMPA ve Kainat reseptörlerini kapsamaktadır. Fizyolojik koşullarda eksitator presinaptik terminallerden salınan glutamat, postsinaptik uça NMDA reseptörü kanalından magnezyum bloğunun ayrılmasına ve hücre içine kalsiyum ve sodyum akışına neden olarak depolarizasyonun oluşmasına neden olur [37]. AMPA reseptörleri sinaps bölgelerinde NMDA reseptörleri ile birlikte bulunarak öğrenme, hafıza, eksitotoksisite ve nöroproteksiyonu içeren sinaptik plastisite süreçlerine ortaklaşa katkıda bulunurlar .

Glutamaterjik işlev bozukluğuyla ilişkili nörodejeneratif hastalıklar, hücredeki kalsiyum dengesinin bozulması, kontrolsüz nitrik oksit sentezinin gerçekleşmesi, serbest radikallerin oluşumu ve ilerleyen nörodejenerasyona yol açan ortak bir patogeneze mekanizmalarını paylaşırlar [38]. Bu mekanizmalar, hücre içi moleküllere zarar verir ve hücreye enerji akışını gerçekleştiren mitokondrinin membran permeabilitesini bozar. Bu durum serbest oksijen radikallerinin oluşumunu tetikleyerek, sitokrom c gibi proapoptotik faktörlerin sitoplazmaya salınmasına aracılık ederler. Serbest oksijen radikallerinin yüksek seviyelerde oluşumu ve antioksidan mekanizmaların disfonksiyonu, nörodejeneratif hastalıklarda nöronal ölümle sonuçlanır [39].

4.1.3. Oksidatif stres

İskemi sonrası hasarla ilişkili moleküler patenlerin (DAMP) salınması sonucu, oksidatif ve nitratif stres, nöroinflamasyon, eksitotoksisite ve apoptoz da dahil olmak üzere birtakım patolojik süreçleri indükler [40]. Oksidatif stres, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunu ile biyolojik sistemlerin bu radikallerin giderilmesini veya hasarını onarması yeteneği arasındaki denge durumunu ifade etmektedir. Aşırı ROS oluşumu, yukarıda da belirtilen patolojik koşullarla etkileşime girerek inme sonrasında ikincil beyin hasarına neden olur [41-43].

Santral sinir sisteminin ana destekleyicisi olan glial hücreler çeşitli yollar üzerinden yüksek miktarlarda serbest radikal salma potansiyeline sahiptirler [32, 44]. ROS'lar, astrositlerde inflamatuvar süreçlerin aktivasyonuna neden olur, glutamat transmisyonunu ve hem hücre içi hem de hücre dışındaki mikro ortamın homeostazını etkilerler [45, 46]. Mikroglialar inme sonrası kan beyin bariyerinin bozulmasına aracılık ederek nöronal onarım süreçlerini de etkilerler. Astrositler ise inme sonrasında meydana gelen oksidatif hasardan korunmak için intraselüller antioksidan konsantrasyonlarını korurlar. Glial hücreler tarafından sentezlenen glutatyon ana antioksidan moleküldür ve oksidatif hasarın önlenmesinde önemli bir rol oynar [47]. Glial hücrelerin mitokondrilerinde yüksek miktarda süperoksit dismutaz bulunur ve bu enzim süperoksiti oksijen ve hidrojen peroksit'e ayırır [48]. Serbest radikallerin parçalanmasında katalaz ve glutatyon peroksidaz da önemli rol oynar [49]. İskeminin erken evrelerinde endotelial NOS'un genellikle nöroprotektif olduğu düşünülür. Düşük miktardaki NO dozlarının penumbra bölgesinde vazodilatasyona neden olarak bölgedeki kanlanmayı düzenleyerek iyileşmeye katkısı olduğu bulunmuştur [50].

ROS'lar fizyolojik dozlar içerisinde vücudun fonksiyonel aktivitelerinin çeşitli yönlerinde görev alırlar. Bir yandan makrofaj fagositozunu artırır ve T hücre aktivasyonunu sağlayarak bağışıklık süreçlerini destekler, diğer yandan ise vasküler hücre proliferasyonunun ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynarlar [51]. Nitrik oksit, damarlarda kanın akışının düzenlenmesine aracılık eder [52]. ROS, yara onarımında çeşitli germinal faktörlerin salınmasını teşvik ederek onarım sürecini kolaylaştırır [22]. Aynı zamanda sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda aktif görevlere sahiptir [53].

4.1.4. İnflamasyon

İskemik inmenin indüklenmesi sonucunda doğuştan gelen bir bağışıklık kaskadı tetiklenir. Beyin iskemisi ile birlikte hücre içi moleküllerin kontrolsüz bir şekilde salınımları hücreleri nekrotik olarak ölüme götürür. Hücre dışı alanda oluşan bu kontrolsüz madde birikimi inflamasyon adı verilen bir durumu uyarır [54]. Bu inflamatuvar tepkiler örüntü tanıma reseptörleri yoluyla aktive olur. Bu reseptörlerden birisi de Toll benzeri reseptörler (TLR)' dir [55]. TLR'lerin uyarılmasıyla birlikte proinflamatuvar genler, sitokinler, adezyon molekülleri ve adaptif bağışıklığın

aktivasyonu indüklenerek doğal bağışıklık yanıtı başlatılır. TLR4 inmede en fazla tanımlanmış olan örüntü tanıma reseptörlerinden biridir ve dimerizasyonu ile birlikte oluşturduğu yanıt kaskadı nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunu tetikleyerek inflamatuvar sitokin üretimini aktive eder [56]. Yapılan bir çalışmada TLR4'ün yokluğunun inme sonrasında oluşan beyin hasarını ve inflamasyonu azalttığı bulundu [57]. Dolayısıyla dolaşımda bulunan insan bağışıklık hücrelerindeki TLR4 ekspresyonu inme geçiren hastalardaki inflamasyon cevabı ile ilişkilidir [58]. Bu nedenle inme sonrası doğal bağışıklığın başlaması için TLR4 aktivasyonu gereklidir. İnme sonrasında ekspresyonları artan DAMP'ler yalnızca beyinde yerleşik olarak bulunan mikrogliaları aktive etmekle kalmazlar, aynı zamanda periferik dolaşımda bulunan bağışıklık hücrelerini de beyin içerisine alırlar ve inflamasyon süreçlerine katkıda bulunurlar [59].

Beyinde hasar gerçekleşmesi durumunda ilk inflamatuvar yanıtlar, beyinde yerleşik olarak bulunan mikrogliaların aktivasyonu ile olur. Homeostaz durumunda beyin sağlıklı bir şekilde işlevini sürdürmesine aracılık eden mikroglialar, komşu hücrelerde bir hasar durumunun algılanmasıyla sitokin ve kemokin salınımlarını gerçekleştirirler. Bundan sonraki süreçte hasar bölgesinde toplanarak farklı morfolojiye bürünür ve ilk inflamatuvar yanıtı oluştururlar. Yapılan çalışmalarda mikrogliya yanıtlarının dinamik olduğunu ve anti-inflamatuvar M2 benzeri fenotiplerin geçici olarak proinflamatuvar M1 fenotiplerine geçiş izlediği görülmüştür [60]. Mikroglialar beyindeki hasara ilk yanıtı sitokinlerin salınması, ölü hücrelerin fagositozla elimine edilmesi şeklinde verdikleri gibi, doku onarımı için gerekli trofik faktörlerin salınmasını da tetikleyerek hasar sonrasında lokal bölgede iyileşme sürecine katkıda bulunurlar [61]. Mikroglialar ek olarak uzantılarını hasar görmüş kan damarlarına doğru uzatarak rozet formasyonu denilen bir şekil alırlar ve bu şekilde de hasarı kontrol altına almış olurlar [62].

Beyinde gerçekleşen inmeden sonra akut fazda, lezyon bölgesindeki ve penumbradaki hücreler transforme edici büyüme faktörü- α (TGF α), IL-1, IL-6, siliyer nörotrofik faktör ve Kallikrein ile ilişkili peptidaz 6 gibi sitokinleri serbest bırakırlar [63]. Bunlara yanıt olarak, hasar çevresinde reaktif astrogliosis oluşur ve santral sinir sistemindeki homeostazın korunması ve hasarın sınırlandırılması için bir glial skar

oluşur [64]. Reaktif astroglioz, astrositik hipertrofi ve glial fibriller asidik proteinin (GFAP) aşırı ekspresyonu sonucu ayırt edilebilir [65]. Astrositler, reaktif astrogliozdan sonraki süreçte, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ve IFN γ gibi proinflatuar moleküller ve nitrik oksit, süperoksit ve peroksinitrit gibi serbest radikaller üretirler [66]. Bu şekilde meydana gelen astrosit proliferasyonu ve glial skar oluşumu nöroinflamasyon projeksiyonunu kısıtlar [67].

İskemik inme nedeniyle iskemik hemisfere periferik dolaşımdan çok sayıda immün hücrelerin geçişi gerçekleşir. Dolaşımdaki nötrofillerin semptom başlangıcından sonraki saatlerde üstel olarak artış gösterdiği ve günlerce yüksek seviyede kaldığı görülmüştür [68].

4.2. Termoregülasyon

Yetişkin memeliler, insanlar da dahil olmak üzere, vücut sıcaklıklarını belirli bir aralıkta korurlar. Bu koruma sistemi yaşamı sürdürüebilmek için oldukça önemlidir, çünkü vücut sıcaklığında oluşabilecek ciddi bir sapma hücresel metabolizmayı etkileyebilir. Aynı zamanda vücut ısısının düzenlenmesi, sinir sisteminin en kritik işlevlerinden biridir [69].

Alınan tek bir ölçüm bölgesinden vücut ısısı hakkında bilgi edinmek doğru olmaz. Yapılan termoregülasyon çalışmalarında, vücudu iki bölümde incelemek gerekir. Bunlardan ilki cildi de içine alan ve çevresel faktörler ile sıcaklık değişimleri gösteren dış kabuğu kapsarken, ikinci bölümünü merkezi sinir sisteminin dahil olduğu iç çekirdek oluşturmaktadır [70, 71]. Çekirdek sıcaklık, termoregülasyon sistemindeki düzenlenen değişkendir [72] ve pozitif-negatif besleme mekanizmalarının bir bileşeni ile muhafaza edilir [73]. Geri bildirim tepkileri, vücut sıcaklığı olması gereken aralıktan saptığında oluşan yanıtlardır. Örnek olarak, egzersiz iç sıcaklığı birkaç derece artırabilecek ısı üretir [74, 75]. İç sıcaklıkta oluşan benzer değişikliklerin tespiti, iç organlar, beyin ve omurilik dahil olmak üzere vücut çekirdeğince var olan spesifik termoreseptörler tarafından yapılır [76]. Bahsi geçen bu iç yapılardan herhangi birisinin alansal olarak sıcaklığının değişmesi, bu değişikliğe karşı oluşan geri besleme tepkilerini meydana getirir. Pozitif besleme mekanizmaları uyarıldığında çekirdek sıcaklıkta hiçbir değişiklik yaşanmaz. Uyarılma sonucunda yaşanması beklenen

sıcaklık ile ilgili sıkıntılar için önleyici yanıtlar oluşturur. Pozitif besleme mekanizmasının bilinen en iyi örneği, hava sıcaklığındaki bir değişikliğin cilt üzerinde bulunan termoreseptörler tarafından tespit edilmesidir. Bu tespit henüz çekirdek sıcaklıkta bir değişim olmadan önce yapılır ve bunun olmasını önleyen termoregülatör tepkileri ortaya çıkarır [72]. Pozitif ve negatif geri besleme sinyallerinin ilettiği vücut ısı ile ilgili bilgiler farklı türde olsa bile bu iletilerin hipotalamusun preoptik alanında (POA) ortak bir nöral substrat ağında birleştiği düşünülmektedir.

Vücut ısının düzenlenmesi fizyolojik ve davranışsal olmak üzere iki mekanizma tarafından gerçekleştirilir. Fizyolojik düzenleme, ısıyı üreten veya dağıtan istemsiz, çoğunlukla da otonomik tepkilerdir. Örnek olarak, soğuğa maruz kalındığı zaman birincil fizyolojik tepkiler, iskelet kası titremesi ve ısı kaybını önleyen kan damarlarının daralmasıdır. Aynı şekilde maruz kalınan sıcak ile, termogenezin baskılanması ve suyun buharlaşması (örneğin terleme) yoluyla ısı kaybının sağlanması, kan damarlarının genişlemesi gibi bir dizi tamamlayıcı otonomik tepkiyi oluşturur. Davranış mekanizması da aynı zamanda vücut ısının kontrolü için önemlidir. Fizyolojik reaksiyonlar istemsizken, termoregülatör davranışlar güdülenebilir ve amaca yönelik eylemlerdir. Öğrenimi pekiştirme yoluyla yapılır, ödül beklentisi içerir [77]. Isı düzenleyici davranış denince akla gelen iki temel davranış vardır. Bunlar hayvanların habitatlarında soğuk ve sıcak alan aramalarıdır. Bunu ısı kaybı veya emilim oranını değiştirmek amacı ile yaparlar. Daha komplike termoregülasyon davranışlar, hayvanların yaşamak için termal ortamlarını inşa ettikleri yuva veya oyuk yapımı [78] aynı türler arasında toplaşıp yan yana durma gibi sosyal davranışlar [79] veya üste bir şeyler giyinmek, klima kullanmak gibi insani davranışları içerir.

Uzun zamandır güçlü bir nöroprotektan olarak bilinen hipotermi'nin deneysel kanıtlar ve kliniklerdeki deneyimler ile, beyni serebral hasardan koruduğunu gösteren ve fokal iskemi ile reperfüzyon mekanizması arasında bulunan ilişki adına yapılan mevcut çalışmalar vardır. Yapılan çalışmalarda hipotermi'nin beyin dokusu üzerindeki koruyucu etkisinin tek yönde değil; beynin enerji tüketimine etkisi, hücre içi asidozun düzenlenmesi, iskemi sürecinde salınımı artan eksitotoksik nörotransmitterlerin salınım paterninin kontrolü ve hücre içi Ca^{+2} akışının azalması gibi çok yönlü olarak

gerçekleştirdiği görülmüştür. Hipoterminin reperfüzyon ile arasındaki ilişkinin ikincil hasarda serbest oksijen radikallerinin sentezini baskıladığı literatürde yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir. Ayrıca kan-beyin bariyeri dejenerasyonu ve iskemi sonrası rejenerasyon ile ilgili yapıların da baskılanmasını sağlar [80]. Hayvan ve insanlarla yapılan çalışmalar yoğun hipoterminin önemli bir koruyucu olduğu, çeşitli kardiyotorasik ve nörocerrahi çalışmalarda uygulandığı, hafif hipoterminin ise fokal iskemik beyin hasarları sonrası iyileştirme özelliğini göstermiştir [81].

Hipotalamus bölgesinde bulunan preoptik alan (POA), optik kiyazma ile ön komissür arasında yer alır. Preoptik alan, terleme ve vazodilatasyon gibi ısı savunmasıyla ilgili davranışların kontrolünü sağlar. Beynin bu bölgesinde, vücut ısısının kontrolünü sağlayan ısıya hassas nöronlar içsel olarak vardır. Egzersiz veya ateşlenme gibi olaylarda, POA vücut sıcaklığında meydana gelen artışı algılar. Aksi yönde dışsal bir uyaranla oluşan çevresel sıcaklık farklılaşmasıyla beklenmedik şekilde karşılaşılırsa beyin etkilenmeyebilir. Beyin sıcaklığı hakkındaki bilgilerin yanı sıra POA'daki nöral topluluklar farklı yollar ile çevresel sıcaklığı kodlayan sinyalleri bir araya getirir. Bu nöronların hemen hemen yarısının uyarımı beynin, derinin veya omuriliğin ısınmasıyla gerçekleşir [82]. Genellikle beyin termostatu olarak görülen preoptik alana girdi, hem periferdeki somatosensoriyel termoreseptörlerden hem de POA'nın sahip olduğu termoreseptörlerden gelir. POA'dan gelen output esas olarak Nucleus Raphe Dorsalis'te (NRD) bulunan Sempato-Motor Komuta Sistemine yönelik inhibitör GABAerjiktir [83].

Preoptik alanda vazomotor tepkilerin düzenlendiği çalışmalarla gösterildi. Yapılan bu çalışmalar, preoptik alan'da bulunan GABAerjik nöronları inhibe etmenin damarlarda daralma oluşturduğunu [84], aktivasyonunu sağlamanın ise damarların genişlemesini tetiklediğini gösterdi [85]. Elde edilen sonuçlar birbirine zıt iki etkinin POA'da yer alan PACAP ve BDNF nöronlarının aktivasyonu ile ayarlandığını ortaya koydu [86]. Yapılan başka bir çalışma, PAG'den gelen terminallere ilave olarak ventral tegmental alan (VTA) ile rRPA, RVLM arasındaki devrelerin de bu yanıtta yerinin olduğunu gösterdi [87].

Dorsal hipotalamusta bulunan GABAerjik nöronlar, POA tarafından tonik inhibisyon altındadır. Bu nöronların inhibisyonu sonucu, raphe pallidus yapılarının

kademeli inhibisyonu ile vücut sıcaklığında bir düşüş meydana gelir [88]. Nükleus Raphe Pallidus (NRP)'daki raphe terimi, vücudu simetrik olarak iki parçaya ayıran sırt anlamına gelir. Bu çekirdek yapısı da beyin sapının orta hattı etrafında bulunduğundan, raphe adlandırılmasıyla yer almıştır. Retiküler oluşumun bir üyesi olarak kabul gören raphe çekirdekleri, beyinde serotonin üretiminin birincil yeri olarak bilinir ve buradan sentezi gerçekleşen serotonin tüm merkezi sinir sistemine dağılır. NRP girdisini dorsal hipotalamik bölgeden alır ancak ana girdi Nucleus Raphe Dorsalis'ten (NRD) gelir. Nucleus Raphe Dorsalis (NRD), beyinde bulunan en büyük serotoninerjik nöron topluluğunu temsil eder. NRD, ana Sempatik-Motor Komuta Sistemi olarak bilinir. Serotonerjik nöronlar sempatik-motor komut sisteminden [89], raphe pallidus çekirdeğine (NRP) projekte olur ve sempatik aktivasyonu indükler [90, 91]. Nucleus raphe pallidus'un modülasyonu DMH'den gelmiş olan dopaminerjik girdiler tarafından yapılır. Preoptik alan ve dorsomedial hipotalamus arasında var olan GABAerjik bağlantı, termoregülasyon üzerinde rol oynayan önemli bir nöronal devredir. Preoptik alan, hipotalamusta yer alan ve vücut ısısının düzenlenmesinde görevi olan bir bölgedir. İçerdiği nöronlar, vücut sıcaklığındaki değişikliklerin kontrolünü ve homeostazisi sağlar. POA ve termoregülasyonda görevli olan DMH arasında ki GABAerjik nöronal bağlantı, bu iki alan arasında iletişimi mümkün kılar. POA'da bulunan GABAerjik nöronlar dorsomedial hipotalamusa projeksiyon yapar ve böylece GABA salınımı gerçekleşir. GABA, beyindeki birincil inhibitör nörotransmitterdir. Salgılanan GABA, dorsomedial hipotalamusta bulunan nöronal aktivitenin inhibisyonunu sağlar. POA'daki sıcaklığa duyarlı nöronlar sayesinde sıcaklık değişimlerinde DMH'e giden GABAerjik projeksiyonları aktive veya inhibe edilir. Vücut sıcaklığı arttığında GABAerjik nöronların aktivasyonu ile vazodilatasyon, terleme gibi durumlara yol açar. Tam tersi durumda ise vazokonstriksiyon ve titreme gerçekleşerek ısının korunmasını sağlayan süreçlerin gerçekleşmesi sağlanır.

4.3. Kahverengi Yağ Dokusu (BAT)

Nucleus raphe dorsalis'in inhibisyonu preoptik alan tarafından sağlanır. Sempatik çıktı yükselince, ısı üretimi, kahverengi yağ dokusu katabolizması, ısı kaybının azalması ve periferik damarlarda daralmanın olması gözlenir [92].

Kahverengi yağ dokusu (BAT), oksidatif metabolizmanın ATP üretimini durdurduğu ve bu süreçte enerjinin tüketildiği termogenez süreci için özelleşmiştir. Bu dokunun termogenik etkisi artan metabolik hız ile sağlanır. Bir zamanlar BAT'ın yalnızca küçük memelilerde ve yenidoğanlarda etkili bir rolü olduğu düşünülüyordu. Fakat yapılan çalışmalar ile soğuğa tepki olarak yetişkin insanlarda da BAT'ın işlevlerine dair bulgular ortaya kondu [93, 94] ve BAT'ın yenidoğan ve küçük memelilerin yanı sıra yetişkin bireyler için de termoregülatör bir görevi olduğu anlaşıldı [95]. BAT'ın potansiyel metabolik rolü, enerji harcamasını değiştirmeyi amaçlayan ilaçlar için potansiyel bir bölge olarak kabul edildi [96]. Sempatik sinir sistemi aktivitesi, periferik ve merkezi termoreseptörlerden gelen girdilere yanıt olarak BAT termogenezini uyarabilir. B3-adrenerjik reseptörlere etki eden katekolaminler, iç mitokondriyal membrandaki bir ayırma proteinini aktive edebilir. Bu ayrıştırıcı protein, termogenin, H^+ 'nin ATP üretimi olmadan mitokondriyal zarı geçmesine izin verir. Soğukta sempatik sinir sistemi aktivitesinin ve termogenezin arttığı bilinir [97]. Buna ek olarak, BAT termogenezini hipoksi, enfeksiyon, hipoglisemi ve psikolojik stres gibi bir dizi termal olmayan faktör tarafından modüle edilebilir. DMH'de bulunan kolinerjik nöronlar, raphe pallidus'taki sempatik premotor nöronlara doğrudan efferent sinyal iletimi gerçekleştirir. Bu alana yapılan yüksek kolinerjik girdi, serotonerjik nöronlar üzerinde olan M2 mAChR'lerin aktivasyonu ile BAT aktivitesini azaltır. Böylece, DMH(ACh)-Rpa(5-HT) yolu doğrudan yüksek çevre sıcaklığına fizyolojik ısı-savunma tepkilerine aracılık edebilir [98].

4.4. Termoregülasyon ve Serebral İskemi

Akut iskemik inme, dünya çapındaki inmelerin yaklaşık %85'inin birincil nedenidir ve sık görülen sebebi serebral kan akışını tıkayan pıhtılar veya aterosklerozdan kaynaklanır [99]. Araştırmalar hastaneye yatış ile ilk müdahale arasında geçen süreyi en aza indirmenin klinik sonuçların düzelebileceğini gösterdi [100]. Bu sebeple günümüzde uzmanlar tarafından inme tedavisinde zamanın önemi sık sık vurgulanır. Uzun süredir inme tedavisinin temel dayanağı olarak trombozlu damarların revaskülarizasyonu ve antiplatelet, antikoagülan ilaçlar kabul gördü [101]. Bu prosedürlerin hızlı bir şekilde yapılması sonucu morbidite azalır ve nörolojik sonuçları iyileşir, ancak bahsi geçen müdahaleler için süre oldukça kısıtlıdır [102].

Çeşitli limitasyonlar sebebi ile, başvuran hastalar gerekli süreyi kaçırmış olarak gelir [103]. Bu yaşanmış bilgiler ışığında inme için alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir.

Terapötik hipotermi, alternatif tedavi için güçlü bir yaklaşım olarak önerildi [104]. Terapötik hipoterminin serebral iskemide protektif etkinliği deneysel modellerde kabul edilir ve yapılan klinik çalışmalar aynı şekilde insanlarda da iyileştirici sonuçlar doğurduğunu gösterir [105]. Hayvan ve klinik çalışmalarla yapılan uzun süreli takiplerle, hipotermi ile tedavi sonrası nörolojik fonksiyonun düzeldiği görülmüştür [10]. Hipotermik proteksiyon ile azalan hasarın iyileşmesine çeşitli yönden katkıları vardır ve ayrıca hipoterminin beyin dokusunun yenilenmesini de arttırdığı çalışmalar tarafından gösterilmiştir.

Enfarktüs hacminin daha çok ilerleme ihtimali ve yaşanabilecek diğer olası kötü senaryolar göz önüne alındığında, terapötik hipoterminin olabilecek en erken zamanda başlaması gerekir [106]. Hipoterminin nöroprotektif etkilerinin iskemi başlangıcında veya en yüksek düzeyde olduğu deneysel modellemelerden elde edilen sonuçlarla da desteklenmiştir [107]. Aynı zamanda, semptomların başlangıcı ile hastaneye başvurulması arasında geçen bir zaman dilimi vardır. Başvuru sonrası hastaya kesin tanı konmadan önce hipotermi de dahil herhangi bir tedavinin uygulanması doğru değildir [108, 109]. Diğer bir taraftan, çeşitli hipotermi metotlarının değişken soğutma hızları, istenilen sıcaklığa varmak için gereken zamanı değiştirebilir [110, 111].

Hipoterminin süresi de bilinen nöroprotektif etkilerle doğrudan ilişkilidir [112]. Hipoterminin optimal süresi bilinmemekle birlikte, yapılan deneysel çalışmalar sonucu elde edilen bulgular, hipotermi süresinin uzun olmasının nöroprotektif etkinliğin daha fazla olabileceğini göstermiştir [113]. Her tedavide olduğu gibi hipotermide de yan etkileri olabildiğince indirirken etkinliği en üst seviyeye çıkarmak asıl hedef olmalıdır.

Uzun yıllardır serebral iskemi için kullanılan yüzey soğutması, endovasküler soğutma, soğutma kaskları, soğuk salin uygulaması gibi yöntemler mevcuttur ancak bilinen yan etkilerinden dolayı alternatif soğutma yöntemlerine ihtiyaç vardır [114].

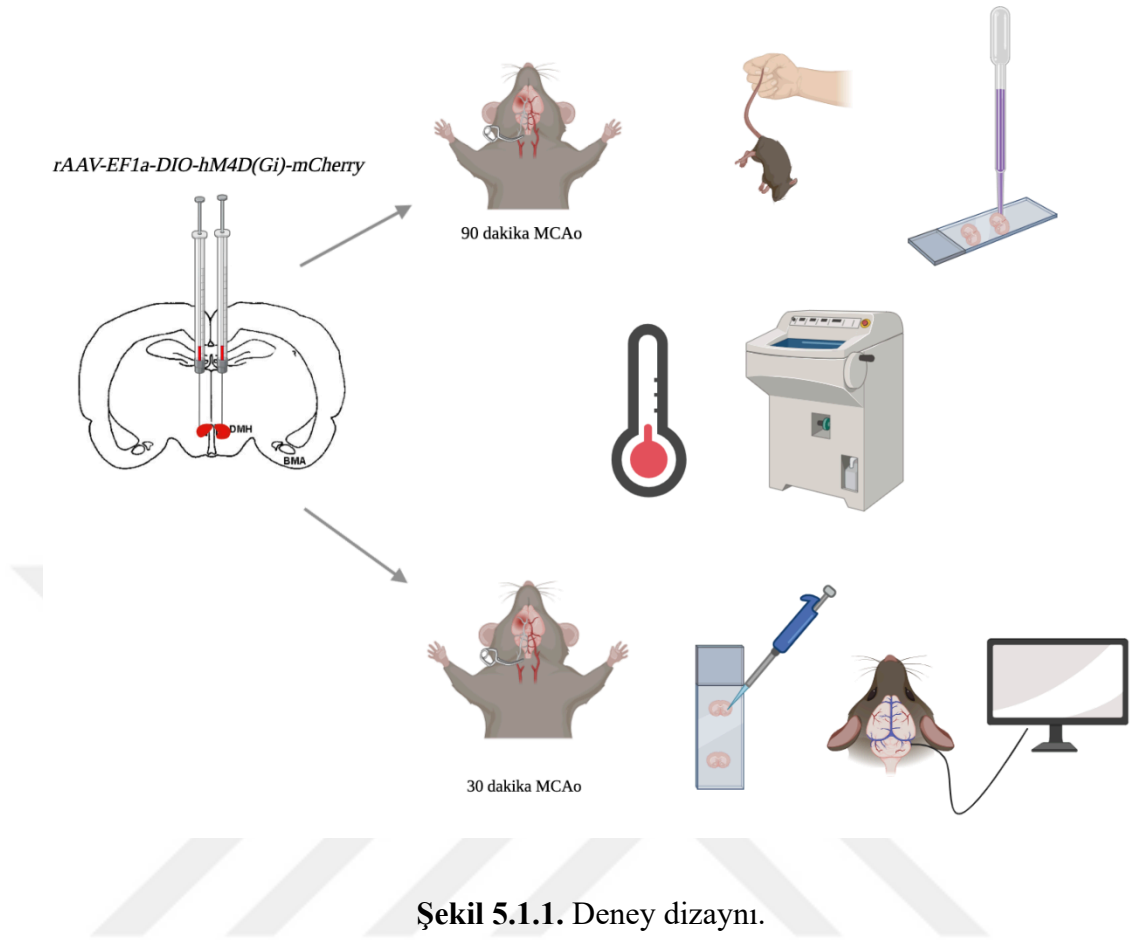
Vücut ısısından da sorumlu oluğu bilinen hipotalamus bölgesinde yer alan DMH, termoregülasyonda çok ciddi bir rol oynar. Hipotermi, dorsomedial hipotalamustaki GABAerjik nöronların inhibisyonu sonucu indüklenebilir. GABA (gama-aminobütirik asit) beyinde bulunan birincil nörotransmitterdir. GABAerjik nöronların inhibisyonu ile burada bulunan nöron aktivasyonu azalır ve dolayısı ile GABA salınımında azalma olur. Böylece DMH'deki var olan inhibitör tonda azalma olur ve vücut ısısının düşmesi gerçekleşir. DMH, vücut sıcaklığında oluşan değişimleri tespit eder ve homeostazın sağlanması için gereken tepkileri başlatmada etkilidir. Yapılan çalışmalar hipotalamusta var olan belirli sinir yollarının indüklenmesi veya engellenmesinin, vücut ısısında önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu alanlara DMH'de dahildir. DMH, ısı üretimi ve korunmasında görevlidir. Tüm bu görevler sebebi ile DMH'in termoregülasyon üzerindeki etkisi çok önemlidir. DMH, vücut ısısı yükseldiği zaman ısyı dağıtmak amacıyla vazodilatasyon, terleme gibi soğutma mekanizmalarının aktivasyonunu sağlar. Diğer bir taraftan vücut sıcaklığı düştüğü zaman ısyı korumak için vazokonstriksiyon veya titreme gibi durumlarla ısınma mekanizmalarının çalışmasını tetikler.

5. MATERYAL METOT

5.1. Deney Planı ve Deney Grupları

Tez kapsamında kullanılan *Slc32a1^{tm2(cre)Lowl/J}* (Jackson Laboratuvarı Stok No: 16962) homozigot transgenik farelerin satın alımı Jackson Laboratuvarı'ndan sağlandı. Bu transgenik farelerin Dorsomedial Hipotalamus bölgesinde bulunan GABAerjik nöronlarında cre enzimi ifade edilir. Bu tez kapsamındaki deney hayvan çalışmalarının tümü etik standartlara, Helsinki Deklarasyonu'na, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Karar no: 31.01.23-11) sayılı etik kurul onayı alındı. Bu tez çalışması için 8-12 haftalık erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanların bakımı 12 saat gündüz/gece düzenine uygun bir şekilde tamamlandı. Farelerin beslenmeleri *Ad libitum* ile sağlanmış olup deney hayvanlarının temini ve bakımı İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM tarafından karşılandı.

Proje kapsamında hipotalamik termoregülasyonun akut beyin hasarı üzerindeki etkisinin gözlemlenebilmesi amacıyla, DMH'de bulunan GABAerjik nöronların kemogenetik olarak inhibe edilmesi için, bilateral olarak, önceden doğrulanmış DMH koordinatlarına rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüs enjeksiyonu yapıldı. Aynı bölgeye rAAV-CAG-DIO-GFP virüs enjeksiyonu yapılan fareler kontrol hayvanı olarak değerlendirildi. 14 gün transgen ifadesinin tamamlanması ve toparlanması beklenen hayvanlara, bekleminin ardından tüm dünyada fokal iskemi vakalarının yaklaşık olarak %85 kadar büyük bir kısmını kapsayan 90 ve 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu (MCAo) modeli kullanıldı. Gruplar *DIO-hM4D* ve *DIO-GFP* olmak üzere ikiye ayrıldı.



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.

5.2. İntrakraniyal Anterograd Floresan Boncuk Enjeksiyonu

İntrakraniyal boncuk enjeksiyonu için 8-12 haftalık erkek fareler %1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O) kullanılarak anestezi altında stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Kafanın düz ve hareketsiz olmasına dikkat edildi, ardından kafa derisi önce tıraşlanıp sonra betadin ile temizlendi ve bisturi yardımı ile kesildi. Kranial koordinatların doğrulanması adına floresan boncuk SteREO Discovery V8 mikroskop altında beyin içi verildi. Narishige mikromanipulatör aracılığıyla Bregma noktasında tüm koordinatlar sıfırlandı ve dorsomedial hipotalamus (DMH) bölgesi için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): -1,5 mm ve Medial/Lateral (M/L): 0,35 mm olacak şekilde konumlandırıldı. Kafatasında belirlenen koordinat freze yardımıyla delindi. Sutter P-1000 Mikropipet puller ile cam mikropipetler ısı yardımıyla çekilerek hazırlandı. Cam mikropipetlerin içlerinden mineral yağ geçirildi ve Narishige enjektöre takıldı. 1:50 oranında fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilmiş kırmızı LumaFluor anterograd floresan boncuk cam mikropipetlere çekildi. Belirlenen A/P ve M/L

koordinatlarına gelindiğinde beyin yüzeyi Dorsal/Ventral (D/V) olarak sıfır kabul edildi ve D/V: -4,9 mm kadar beyin içine girildi. Narishige enjektör kullanılarak 80 nL enjeksiyon yapıldı. Beyin içinde 10 dakika bekleme sonrasında cam mikropipet beyinden çıkarıldı. Boncukların anterograd olarak ilerleyebilmesi için fareler birkaç gün bekletildi. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri disekte edildi. Beyinler ilk olarak +4 °C'de 8 saat %4'lük paraformaldehit (PFA) (158127, Sigma-Aldrich), sonra +4 °C'de 24 saat %30'luk sükröz (800-081-LG, Wisent Inc.) çözeltisinde bırakıldı. VT1000S vibratom ile 60 µm kalınlığında kesitler görüntülenmek üzere alındı ve Axiozoom mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss) vasıtasıyla koordinatlar doğrulandı.

5.3. Rekombinant Adeno-asosiye Virüs Üretimi

Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi için, Addgene firmasından kompetent Stbl3 E. Coli transformasyonu ile yapılmış ve ampisiline direnci olan pAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (50461, addgene) ana vektörünü içeren plazmitleri ile AAV packing plasmid expressing Rep/Cap genes: pAAV2/1 2/1 yardımcı vektör (112862, addgene) ve pAdDeltaF6 helper yardımcı vektör (112867, addgene) plazmitlerinin satın alımı yapıldı. Plazmitler jel besisi yerinde bakteriyel sürüntü olarak elde edildi ve sonrasında çoğaltılma işlemine başlandı.

5.3.1. Plazmit DNA'nın çoğaltılması

Luria agar (LB-agar) (A8523, Biomatik) çözeltisi (35 g/L oranında H₂O ile karıştırılmış) otoklav cihazı kullanılarak sterilize edildi. Bu karışıma, soğumasının ardından antibiyotik direnci sağlanması için 100 µg/mL ampisilin eklendi. 10 santimetre polistiren kaplarına 2/3'ü dolacak şekilde dökülen LB agar donmaya bırakıldı. Plazmitler katılaştıran agara sürüldü ve yayılması sağlandı. Petriler gece boyu bu şekilde 37 °C'de bekletildi. Gün sonunda petrilerin üzerinde bakteri kolonilerinin varlığı saptandı. Koloniler öze yardımıyla toplandı ve ardından otoklavlanmış LB sıvısı (20 g/L) besisi yerine (LB-Broth) transferi gerçekleştirildi. Sıvı besisi yerindeki bakteriler 37 °C, 250 rpm koşullarında çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. 18 saat bekletilen besisi yerindeki bakteriler sürenin sonunda olmaları gereken sayıya erişti ve 15 dakika 4 °C 6500 rpm'de santrifüj edildi, oluşan süpernatant atıldı ve kalan çöktürler -80 °C'de dondurularak muhafaza edildi. Tüm bu prosedür pAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-

mCherry ana vektör, AAV packing plasmid expressing Rep/Cap genes: pAAV2/1 2/1 yardımcı vektör (112862, addgene) ve pAdDeltaF6 helper yardımcı vektör (112867, addgene) adına tekrardan yapıldı.

5.3.2. DNA izolasyonu

Ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper plazmitleri 150 mL LB sıvı besi yeri içerisinde 16 saat, 37 °C, 250 rpm koşullarında çalkalayıcı inkübatörde büyütüldü. Sürenin sonunda 5 dakika 4 °C 6500 rpm’de santrifüj edildi ve supernatant atıldı.

Plazmit izolasyonu için Zymopure II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo, D4203) protokolü takip edildi. Elde edilen bakteri pelletine 14 mL P1 solüsyonu eklendi, ve pipetaj yaparak pellet çözdürüldü. Üzerine 14 mL P2 solüsyonu eklendiği gibi hemen ters çevirerek karışması sağlandı ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Nötralizasyonun gerçekleşmesi için 14 mL P3 solüsyonu eklendi ve ters çevirerek karıştırıldı. Örnekler Zymopure şırınga filtre-X içerisine döküldü ve 5 dakika oluşan çökeltinin üste çıkması için beklendi. Temiz 50 mL tüpe yaklaşık 35 mL berrak lizat oluncaya dek filtrelendi ve 14 mL bağlayıcı solüsyon eklenerek karışması sağlandı.

Zymo-Spin™ V-PX kolon düzeneği vakum sistemine yerleştirildi ve lizatın tamamı kolona yüklendi. Ardından vakum açılarak tüm sıvının kolondan geçmesi beklendi ve üstteki 50 mL rezervuar Zymo-Spin™ V-PX kolon düzeneğinin üzerinden çıkarıldı. Kolona 10 mL yıkama solüsyonu 1 eklendi ve tüm sıvı kolondan geçirildi. Sonrasında 10 mL yıkama solüsyonu 2 eklendi ve tüm sıvı tekrar kolondan geçirildi. Aynı şekilde 10 mL yıkama solüsyonu 2 eklendi, tüm sıvı kolondan geçirildi ve iki dakika daha vakum açık tutuldu. 15 mL rezervuar-X düzenden çıkarıldı ve kolon toplama tüpüne yerleştirilerek 16.000 xg’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Kolon 1,5 mL Eppendorf tüpüne transfer edildi ve 400 µl Nükleaz içermeyen su doğrudan kolon matriksinin üzerine bırakıldı. 5 dakika beklendi ve 1 dakika boyunca 16.000 xg’de santrifüjlendi. Elde edilen DNA’ların konsantrasyonları Nanodrop (Nanodrop One, ThermoFisher) cihazı ile tayin edildi. Elde edilen plazmid stokları -20°C de muhafaza edildi. Tüm bu işlemler ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper için tekrar edildi.

5.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu

Rekombinant adeno-asosiy virüs üretimi amacıyla 293AAV hücre hattı ticari olarak sağlandı (Cell BioLabs, AAV-100). 10x10 cm boyutundaki petrilere yaklaşık 10^6 293AAV hücresi ekildi ve 37 °C, %5 CO₂, %20 O₂ şartlarında bulunan inkübatörde büyütülmeye bırakıldı. Hücrelerin yoğunluğu %70-80'lere ulaştığı zaman pasaj yapılarak çoğalması sağlandı. Hücreler gerekli yoğunluğa ulaştığı anda transfeksiyon için hazırlanmaya başlandı. 24 µg yardımcı vektör helper steril tüpün içinde, 2/1 20 µg yardımcı vektör, 12 µg olan pAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ana vektör, Opti-MEM (51985-026, Gibco) transfeksiyon medyumunu ve son olarak polietilenimin transfeksiyon ajanı karıştırıldı. Hücrelerin üzerine eklenen bu karışım 37 °C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında 72 saat inkübatörde bekletildi. Hücreler 72. saatin bitiminde toplandı ve 5 dakika 4 °C 1200 rpm'de santrifüjlendi. Hücrelerin içinde olduğu çökelti -80 °C'de donduruldu.

5.3.4. Pürifikasyon

Dokuz mL steril liziz çözeltisi (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0) ile hücrelerin içinde bulunduğu çökelti karıştırıldı. Kuru buz ve %70'lik etanol (EtOH) birbirlerine karıştırılıp bu karışıma alınan hücreler burada 2 dakika bekledi. Ardından 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda ikişer dakika daha bekleme süresi oldu. 3 defa tekrarlanan işlemin ardından hücrelere 3 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda hücrelerin içinde var olan virüsler açığa çıkmış oldu. Pürifikasyon işlemi, virüsleri hücre lizizlerinden arındırmak amacıyla yapıldı. Hücre lizizi ve virüsün bulunduğu karışıma 1 mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonaz (Sigma E8263-25K) eklemesi yapıldı. 4 °C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Pürifikasyon için %17, %25, %40 ve %60 oranında çözelti hazırlandı. 17%'lik çözelti için 5 mL 10x fosfatlanmış tampon solüsyonu (PBS), 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 10 mL 5M NaCl, 12,5 mL Iodixanol karıştırıldı ve 50 mL'ye kadar H₂O eklemesi yapıldı. 25%'lik çözelti hazırlamak için 5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 20 mL Iodixanol, 0,1 mL 0,5%'lik fenol kırmızısı karıştırıldı ve 50 mL'ye gelene kadar H₂O eklendi. 40%'lık çözelti için 5mL 10x PBS, 0,05 mL 1 M MgCl₂, 0,125 mL 1 M KCl, 10 mL 5 M NaCl, 33,3 mL Iodixanol ve yine 50 mL'ye tamamlanana kadar H₂O eklendi. Son olarak 60%'lık çözelti hazırlamak için için 0,05 mL 1 M

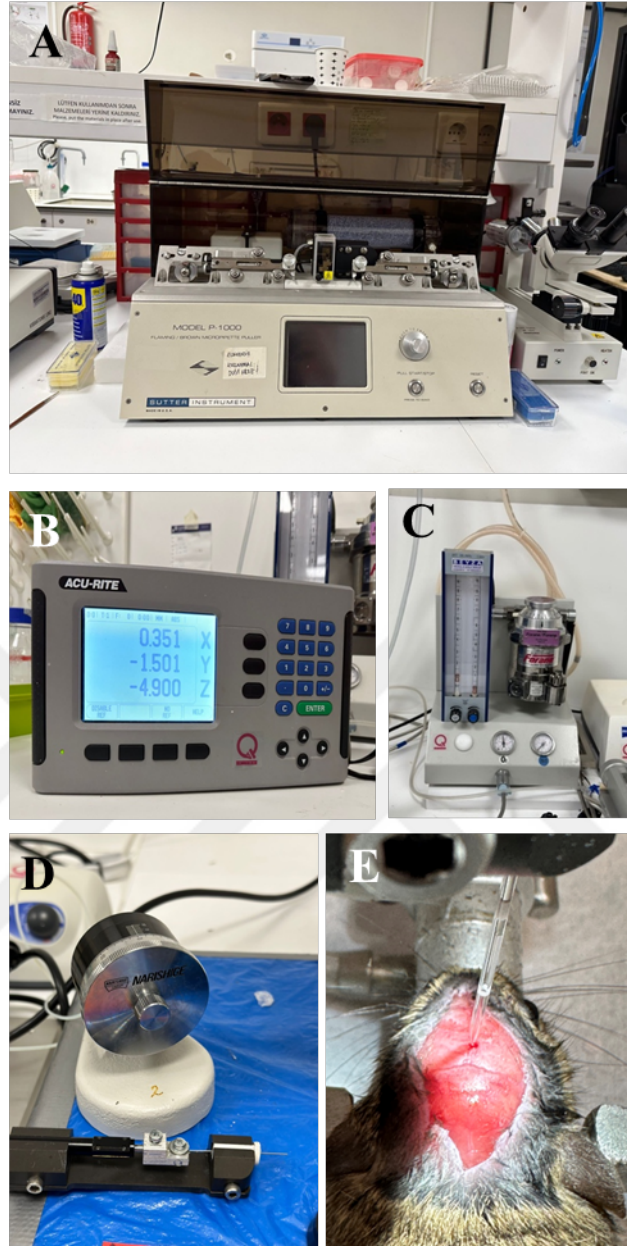
MgCl₂, 0,125 mL 1 M KCl, 50 mL Iodixanol, 0,025 mL 0,5%'lik fenol kırmızısı ile karıştırıldı ve böylece tüm çözeltiler tamamlanmış oldu. Oluşturulan bu çözeltiler, yüzde sıralarını dikkate alarak şırınga aracılığı ile %60'lık çözeltiden 3 mL, %40'lık çözeltiden 5 mL, %25'lik çözeltiden 6 mL, %17'lik çözeltiden de 6 mL ve en son hücre lizatı olacak şekilde sırasıyla Optiseal ultra santrifüj tüplerine (Beckman 361625) hassas bir şekilde damlatıldı. 18 °C sıcaklığında 60000 rpm'de 1,5 saat santrifüjlendi. Santrifüj bittikten sonra %40'lık çözeltilerin var olduğu katmanda virüsler birikti. Optiseal ultra santrifüj tüpüne ufak bir delik açıldı ve şırınga aracılığı ile bu katman aspire edildi. İçeriğinde 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl bulunan 1L 1x tampon çözeltisi, Amicon 100K filtreli kolonlarını (Millipore, UFC910024) ıslattı ve 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Sonrasında %40'lık çözelti katmanı (içinde virüsleri barındıran katman), ıslanmış filtreli kolonlara aktarıldı, ardından 15 mL'ye getirecek hacimde 1x tampon çözeltisi katıldı. 3500 rpm'de yarım saat boyunca 4 °C'de santrifüjlendi. Santrifüjün ardından alt kısmında birikmiş olan çözelti kolondan atıldı ve üst kısmına 1x tampon çözeltisi katılarak (15 mL'ye kadar getirecek hacimde) 3500 rpm'de yarım saat boyunca 4 °C'de santrifüj yapıldı. Bu prosedür 3 kez art arda tekrarlandı. Filtreli kolonun üst tarafındaki çözelti alındı (virüslerin bulunduğu katman), alikodlandı. Tüm bu işlemlerin sonunda virüsler -80 °C'de donduruldu ve muhafaza edildi.

5.4. Deney Hayvanı Çalışmaları

5.4.1. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu

8-12 haftalık DMH^{Vgat2} erkek fareler %1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O) kullanılarak anestezi altına alındı ve bu şekilde stereotaksik çerçeveye sabitlendi. Çerçeveye yerleştirilen farelerin önce kafa bölgesinde bulunan tüyleri tıraşlandı ve ardından kafa derileri antiseptik betadin ile temizlendi. Operasyona başlamak için kafa derisi bisturi yardımı ile kesildi. Tüm işlem boyunca SteREO Discovery V8 mikroskop kullanıldı. İntrakraniyal anterograd floresan boncuk enjeksiyonu ile doğrulanan Dorsomedial Hipotalamus bölgesinin koordinatlarının tekrar belirlenmesi için Narishige mikro-manipülatör kullanıldı. Koordinat sisteminde Bregma noktasına gelindiğinde tüm değerler sıfırlandı ve belirlenen koordinatlara

hedef alındı. Dorsomedial Hipotalamus (DMH) bölgesinin koordinatları, anterior/posterior (A/P) düzleminde -1,50 mm ve medial/lateral düzleminde $\pm 0,35$ mm ve dorsal/ventral (D/V) düzleminde 4,9 mm olarak belirlendi. Belirtilen koordinat noktalarına freze yardımıyla delikler açıldı. Sutter P-1000 marka mikropipet çekici, camı ısı yardımıyla çekerek mikropipet oluşturan bir cihazdır. Bu cihazı kullanarak intrakraniyal enjeksiyon için ihtiyacımız olan mikropipetler elde edildi. Cam mikropipetlerin içi mineral yağ ile dolduruldu ve Narishge mikromanipülatörün enjektör kısmı ile birleştirildi. Hazırlanmış olan rekombinant adeno-asoiye virüsler, cam mikropipet içerisine çekildi. Enjeksiyona başlamadan önce koordinat düzleminde herhangi bir kayma veya değişim olup olmadığından emin olmak adına A/P ve M/L düzlemleri son bir kez kontrol edildi. Beyin yüzeyi dorsal/ventral (D/V) düzlemde sıfır olarak kabul edildi ve cam mikropipet beyin içine oldukça yavaş bir şekilde girmeye başladı. Bilateral gerçekleştirilecek olan intrakranial enjeksiyonların ilki medial/lateral düzlemin pozitif tarafına yapıldı. Dorsal/ventral (D/V) düzlemde ilk olarak -4,90 mm noktasına ulaşıldı ve 20 nL/dk hızıyla 200 nL hacminde virüs DMH bölgesine enjekte edildi. Hızlı ve çabuk bir çıkma ile virüsün pipet içine geri dönmesinin önüne geçmek adına 10 dakika geline nokta sabit beklendi. Sonrasında oldukça yavaş -4,75 mm noktasına yukarı hareket edildi. Bu alana da, 20 nL/dk hızıyla 200 nL hacminde virüs verildi. Cam mikropipet beyinden çıkarılırken çok hassas ve yavaş davranıldı. Ardından pozitif tarafa yapılan işlemlerin aynısı medial/lateral düzlemin negatif tarafına da uygulandı. Sağ ve sol olmak üzere toplamda 800 nL rekombinant adeno-asoiye virüs enjeksiyonu yapılmış oldu. Enjeksiyonların ardından cam mikropipet beyin içerisinden yavaşça çıkarıldı ve farelerin bistüri ile açılmış olan kafa derileri kafada açıklık kalmayacak şekilde dikildi. Farelerin operasyon sonrası bakımı 14 gün sürdü. Bu 14 gün içerisinde fareler hem kendilerini topladılar hem de transgen ifadesinin tamamlanması beklenmiş oldu.



Şekil 5.4.1.1. Beyin içi enjeksiyon düzeneği. A) Sutter P-1000 Mikropipet puller, B) Koordinat sistemi, C) Portatif Anestezi Cihazı D) One-axis Oil Hydraulic Mikromanipulator- Narishige, E) DMH bölgesi enjeksiyon.

5.4.2. Vücut sıcaklığını değerlendirme ve açık alan testi

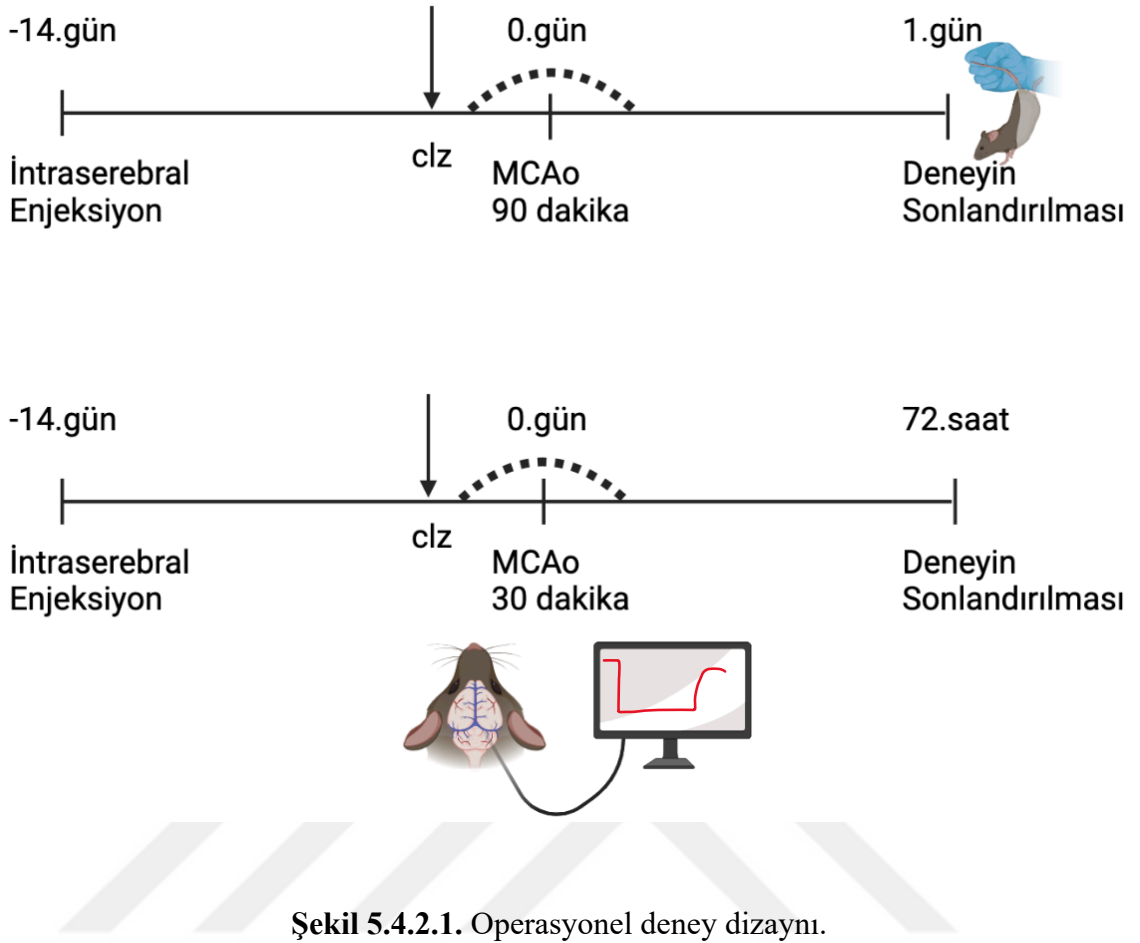
Dorsomedial Hipotalamus bölgesinde yer alan GABAerjik nöronlarının termoregülasyon üzerindeki etkinliğinin anlamlandırılabilmesi adına öncelikle buradaki nöronlar, kemogenetik metodlar ile inhibe edildi. 8-12 haftalık erkek farelere intrakraniyal yöntem kullanılarak *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüs enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubu için, kemogenetik bir etkinliği olmayan *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsünün enjeksiyonu yapıldı. Vücut sıcaklığı ölçülmeden ve lokomotor değerlendirme yapılmadan 30 dakika önce farelere intraperitoneal yöntemle 0,1 mg/kg klozapin enjeksiyonu yapıldı ve DMH’de yer alan GABAerjik nöronların inhibisyonu sağlandı.

Açık alan testi, farelerin motor aktivitelerin ve bölgedeki gözlem benzeri davranışların anlık olarak tespit edildiği bir yöntemdir. Çapı 150 cm, yüksekliği 35 cm olan bir alanda fareler 10 dakika süresince izlendi. Silindir, sanal olarak üç alana bölündü. Bu işlem için Anymaze programı kullanılmıştır ve farelerin alınan mesafe, hız, aktif zaman değerlendirilmesi yapıldı [115].

5.4.3. Serebral iskemi modelinin uygulanması

Serebral iskemi için model olarak orta serebral arter oklüzyonu (MCAo) seçildi. Beyin içi enjeksiyonu yapılmış 8-12 haftalık DMH^{Vgat2} erkek farelere hem iyileşmek hem de transgen ifadelerinin tamamlanması adına bekledikleri 14 günün ardından MCAo modeli uygulandı. Operasyondan 30 dakika önce farelere intraperitoneal yöntemle 0,1 mg/kg klozapin enjeksiyonu yapıldı ve DMH’de yer alan GABAerjik nöronların inhibisyonu sağlandı. Deney dizaynı gereği operasyonlar 90 ve 30 dakikalık 2 model olarak gerçekleştirildi. Operasyon boyunca fareler %1 izofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O) altında anestezide alındı. Kan akımını anlık takip edebilmek adına, orta serebral arterin beslediği bölgenin üzerine (bregma noktası sıfır alınarak, -2 mm posterior, 6 mm lateral) fiberoptik kablo yerleştirildi ve lazer doppler cihazı (LDF) (Periflux System 5000) kullanılarak kan akımı izlendi. Operasyon süresi boyunca farelerin vücut sıcaklıklarını 36.5-37°C’de tutuldu ve bunun kontrolünün sağlanması için geri bildirimli ısıtıcı sistemler kullanıldı (69020, ThermoStar Homeothermic Monitoring System, RWD). Boyun bölgesine orta hattın bistiği

yardımı ile bir kesi atılarak operasyona başlandı ve 6-0 ipek ipe (S1165, Doğsan) karotis kommunis ve karotis eksternaya düğümler atıldı. Düğümlerin ardından karotis kommunis üzerine ufak bir kesi atıldı ve uç kalınlığı 180-190 µm olan silikon filamentin arter içine girişi yapıldı ve başlangıcı bifurkasyon olacak şekilde, hissedilen ilk dirence kadar yaklaşık olarak 9 mm orta serebral arter başlangıcına kadar itildi. Takip edilen LDF’de %80-85 oranında düşen kan akımının görülmesinin sonrasında orta serebral arter, belirlenen 90 dakika boyunca tıkalı kaldı. Sürenin sonunda reperfüzyonun sağlanması için filament geri çekildi. İşlem bittiğinde farenin boyun ve de kafa derisi 5-0 ipek ipe (S2165, Doğsan) dikilerek gözlemlenmek üzere kafeslerine alındılar. Operasyon sonrası 24 saat reperfüzyonun ardından, farelerin nörolojik skorlamaları alındı. Sakrifikasyonlar izofluran kullanılarak derin anestezide gerçekleştirildi. Anesteziye giren hayvan dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Hemen sonra, zaman kaybetmeden beyin diseksiyonu tamamlandı ve disekte edilen beyin kuru buz üzerine alınarak donduruldu. Dondurulan beyinlerin kesim işlemi soğuk alan mikrotomunda (cryostat, CM1950, Leica) gerçekleştirildi. Yapılan tüm bu işlemlerin, orta serebral arterin 30 dakika boyunca tıkalı kalması ve operasyon sonrası 72 saat reperfüzyon süresi olması dışına aynısı tekrar uygulandı ve elimizde hem 90 hem de 30 dakika MCAO modeli uygulanmış beyinler oldu.



Şekil 5.4.2.1. Operasyonel deney dizaynı.

5.4.4. Lazer Speckle görüntüleme tekniği

Otuz dakika orta serebral arter tıkanması modeli gerçekleştirilmeden yarım saat önce DMH^{Vgat2} nöron inhibisyonunun termoregülasyon üzerinde olan etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla *DIO-hM4D* grubu ve *DIO-GFP* grubu farelere intraperitoneal yöntemle 0,1 mg/kg klozapin enjeksiyonu yapıldı ve DMH nöronlarının inhibisyonu gerçekleştirildi. Ardından fareler %1 İzofluran (%30 O_2 , kalanı N_2O) ile anestezi altına alındı. Stereotaksik çerçeveye sabitlenen farelerin kafa bölgesine ufak bir kesi atıldı. Tur aleti (H37L1, Marathon) yardımı ile her iki hemisferde beyin kan akımı ölçümünün gerçekleştirileceği alanın kafatası kemikleri delindi. Delinen kemikler bir kanama durumu olmaması adına operasyon boyunca yerinden oynatılmadı. Operasyonu takiben bölgesel kanlanma bir dakika boyunca LDF cihazı ile izlendi ve sonrasında önceden delinen kafatası kemikleri kaldırıldı. Ölçümler ipsilateral ve kontralateral bölgelerinden yapıldı ve bu sebeple ölçüm öncesi o bölgeler serum

fizyolojik ile temizlendi. Temizliğin ardından fareler stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Farelere iskemi modeli uygulanmaya başladı ve Lazer Speckle (PeriCam PSI, Perimed) cihazı ile (Şekil 5.4.3.1.) gerçek zamanlı bölgesel kan akımı takibi yapıldı. Lazer Speckle cihazı ile görüntü alma kafatası üzerinden 10 cm yükseklikte olan CCD kamera aracılığı ile sağlandı. Dalga boyu 785 nm olan lazer beyne gönderildi ve beyinden 500 μm kadar içeri girdi. Operasyon boyunca boşlukları 2 saniye olacak şekilde ile 20 μm çözünürlüğünde görseller kayıt altına alındı. Seviye olarak iskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks bölgelerinden beyindeki kan akımı ölçümünü gerçekleştirmek için bilgisayarda bulunan bir program yoluyla 1 mm x 5.5 mm ebatındaki alanlar, Bregma noktasından 0,5 mm posterior alınarak sırayla 0.5 mm (hasarsız korteks), 1,5 mm (penumbra) ve 2,5 mm (iskemik kor) merkez lateralde olmak üzere konumlandırıldı. Elde edilen veriler operasyon öncesi alınan kayıtlara göre yüzde değişim olarak hesaplandı.



Şekil 5.4.3.1. Lazer Speckle cihazı.

5.4.5. Nörolojik skarlama

Doksan dakika orta serebral arteri oklüzyonu modellemesi yapılmış olan farelerin 24 saatlik reperfüzyon süresinin ardından sakrifikasyon gerçekleşmeden kısa süre önce nörolojik skorları değerlendirildi. Nörolojik skorlamada değerlendirme kriterleri aşağıda gösterilen yönergeler ışığında alındı.

0= Hiçbir bir nörolojik kısıtlama yoksa

1= Ön ayağını çekiyorsa

2= Ön ayağını çekiyorsa ve bu süre zarfında harekette karşı bir direnç varsa

3= Hareketlerini daire çizerek yapıyorsa

4= Daireler sürekliyse ve kranial-kaudal aks doğrultusunda dönme gerçekleşiyorsa

5= Hiçbir hareket yoksa

5.5. Beyinden Örnek Alınması

İskemi sonrası 24/72 saat reperfüze olan fareler izofluran gaz anestezisi ile derin anestezide alınarak dekapitasyon ile sakrifiye edildi ve beyinler disekte edildi, hemen kuru buz üzerine alınan beyinler hızla donduruldu. Dondurulan beyinlerden immünohistokimya çalışmaları için kryostat cihazında (CM1950, Leica) (**Şekil 5.5.1.**) Bregma seviyesinden 18 µm'lik koronal kesitler alındı. 18 µm'lik koronal kesitler pozitif yüklü lamalar (Objektträger; Isotherm) üzerine alındı. Lamlar üzerindeki kesitler 40 °C' deki ısıtıcı tabla üzerinde (Wise Term, Wisd Laboratory Instruments) 20 dakika boyunca bekletilerek doku kesitlerinin lamlara sabitlenmesi sağlandı. Elde edilen kesitler -80 °C de muhafaza edildi ve immunofluoresan boyamalar için kullanıldı. Ayrıca kesim sırasında protein çalışmalarında kullanılmak üzere hasarlı ve hasarsız striatum seviyesinden doku örnekleri alındı.



Şekil 5.5.1.: Kryostat cihazı.

5.6. Cresyl Violet Boyaması

90 dakika iskemi modeli uygulanmış hayvanlardan alınan kesitlere beyinlerindeki hasar hacminin ve beyin ödeminin saptanması için Cresyl violet (C5042-106, Sigma Aldrich) boyaması yapıldı. İzlediğimiz protokol doğrultusunda endoplazmik retikulumda yer alan nissl cisimcikleri mavi-mor rengine boyanır. Buna karşın yaşamayan doku alanlarına hiçbir renk değişimi saptanmaz. Boyama için öncelikle kesitler -80°C 'den çıkarıldı. Oda sıcaklığındaki bir ortamda yarım saat bekletildi ve sonrasında kesitlerin %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonunda 15 dakika inkübasyonu sağlandı. Kesitler 0.1 M fosfatlanmış tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Yıkama tamamlanan kesitler 2 dakika masa üzeri, 13 dakika ise çalkalayıcı üzerinde Cresyl violet boyası ile boyanmaya bırakıldı. Boyanması tamamlanan kesitler, her birinde 5-15 saniye arası (rengin açılma derecesine göre) inkübasyonu olacak şekilde sırasıyla %70, %90, %95 ve %100'lük etanol (24102, Sigma Aldrich) alkol serisinden geçirildi. Boyanın fikse olması amacıyla kesitler alkol serisinin ardından ksilen (108684, Merck) solüsyonuna alındı. Son olarak yapıştırıcı malzeme olarak entellan (M1289, Sigma Aldrich) kullanıldı ve lamelle kapatıldı. Görüntüleme Axiozoom mikroskobu ile (Axiozoom V16, Zeiss) yapıldı. Çekilen görüntülerde hasar

ve hasar dışı alanlar ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı ile ölçülerek hasar hacmi ve beyin ödemi hacmi analizleri yapıldı.

5.7. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İmmunoglobulin G Boyamasıyla İncelenmesi

İmmunoglobulin (IgG) boyaması Vectostain Elite ABC HRP Reagent R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories) kiti kullanılarak yapıldı. Boyama için -80 °C'den çıkarılmış olan 90 dakikalık iskemi geçirmiş ve ardından 24 saatlik reperfüzyonu sağlanmış farelerin kryostat cihazında (CM1950, Leica) alınmış olan koronal kesitleri 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bir ortamda bekletilerek kuruması beklendi. Kuruması tamamlanan beyin kesitlerinin fikse olması adına 15 dakika %4'lük PFA solüsyonunda beklemesi yapıldı. 15 dakikalık fiksasyon bitiminde beyin kesitleri PBS çözeltisine yıkanmak üzere alındı. %0,3 H₂O₂ içeriğine sahip metanolde yarım saat inkübe edilen kesitler tekrardan yıkanmak üzere PBS çözeltisine alındı. Bloklamanın yapılması için normal at serumu (NHS, vectostain) kullanıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu sağlandı. PBS ile yıkanması yapılan örneklerin üzerine ikincil antikor eklenerek (biyotinlenmiş) 10 dakika daha inkübasyon için beklendi. Örnekler PBS ile tekrardan yıkandı ve streptavidin/peroksidaz bileşeni ile beş dakika inkübe edildi. Kitin içinde bulunan solüsyonlar kullanılarak, kullanım kılavuzunu takip edecek şekilde DAB substrat solüsyonu hazırlığı yapıldı. Örneklerin üzerlerine hazırlanan DAB substrat solüsyonu eklenmesi yapılarak reaksiyon başlatılmış oldu ve yaklaşık bir buçuk dakika sonunda reaksiyon soğutulmuş PBS çözeltisi yardımı ile kesildi. İşlem sonunda örnekler entellan (M1289, Sigma Aldrich) ve lamel ile kapatıldı.

5.8. İn-sitü Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile DNA Kırıklarının Belirlenmesi

İmmünohistokimya çalışmalarını gerçekleştirmek için alınan koronal beyin kesitlerinden DNA kırıklarının in sitü olarak tanınması ve apoptotik olarak hücre ölümü tayininin yapılabilmesi adına TUNEL kiti (11684795910, Roche) kullanıldı ve apoptotik hücre tespiti yapıldı. Bu amaç doğrultusunda -80 °C'den çıkarılan 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modeli uygulanmış olan ve ardından reperfüzyon için 72 saatlik bekleme süresi tamamlanıp kurban edilen farelerin beyin

kesitlerinin yarım saat oda sıcaklığındaki bir ortamda kuruması beklendi. Kuruması tamamlanan kesitler fikse edilmek için önce 10 dakika %4'lük PFA solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında, sonrasında +4 °C'de 10 dakika bekletildi. Fiksasyonun tamamlanmasıyla kesitler yıkanmak üzere PBS çözeltisine alındı. Uygun solüsyonlarla membran por geçirgenliği ve antijen geri kazanımı elde edilmesinin ardından, kesitlerin oda sıcaklığında yarım saat bloklama işlemi için normal keçi serumunda (NGS, G9023, Sigma Aldrich, ABD) inkübasyonu sağlandı. Bloklama işlemi sonrasında koronal kesitler enzim ve substratını içeren TUNEL karışım kiti ile 37 °C sıcaklıkta 1 saat 10 dakika inkübe edildi. Hücre çekirdeğinin görüntülenmesi amacıyla 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) boyaması gerçekleştirildi ve kapatılması yapıldı. Boyama sonunda gerekli değerlendirmelerin yapılabilmesi için iskemik striatumdan dokuz alan belirlendi ve o bölgelerden fotoğraflar alındı. Fotoğraflanan bölgede TUNEL(+) hücreler saptanıp sayımları yapıldı.

5.9. NeUN Boyaması ile Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi

Nöronal sağkalımın analiz edilebilmesi amacıyla beyin kesitleri -80 °C'den çıkartıldı ve yarım saat oda sıcaklığında kuruması beklendi. Ardından %4'lük PFA solüsyonu ile oda sıcaklığında fiksasyonu gerçekleştirildi. Fiksasyon sonunda kesitler PFA'dan arındırılmak için PBS çözeltisine geçirildi. Kesitlerin oda sıcaklığında yarım saat uygun bloklama solüsyonunda inkübe olması için beklendi. Yarım saatlik beklemenin sonrasında koronal beyin kesitleri NeUN primer antikoru kullanılarak 16 ile 18 saat arasındaki süre zarfında inkübe edildi. Inkübasyon süresinin sonunda kesitlerin yıkaması PBS ile yapıldı. Hücre çekirdeğinin saptanabilmesi adına 4'6-diamidinde-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI, D9542, Sigma Aldrich) çekirdek boyaması yapıldı. Boyama işlemi bittikten sonra kesitlerin üzeri, uygun bir kapama sıvısı ve lamelle kapatıldı. Kesitlerin görüntülenmesi konfokal mikroskobu ile sağlandı. Sağlam nöronların analizinin yapılabilmesi için striatum bölgesinden gelişigüzel seçilen 62.500 µm²'lik 9 bölgede her iki hasarlı ve hasarsız alandaki çekirdek boyaması ile çakışan NeuN (+) hücre sayımı yapıldı.

5.10. İstatistiksel Analizler

GraphPad Prism (RRID:SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı istatistiksel analizlerin yapılabilmesi için kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi Bağımsız örneklem t-testi (Independent Sample T-Test) kullanılarak gerçekleştirildi. Alınan tüm değerler $\pm$ standart hata (SEM) olarak gösterilmiştir ve * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

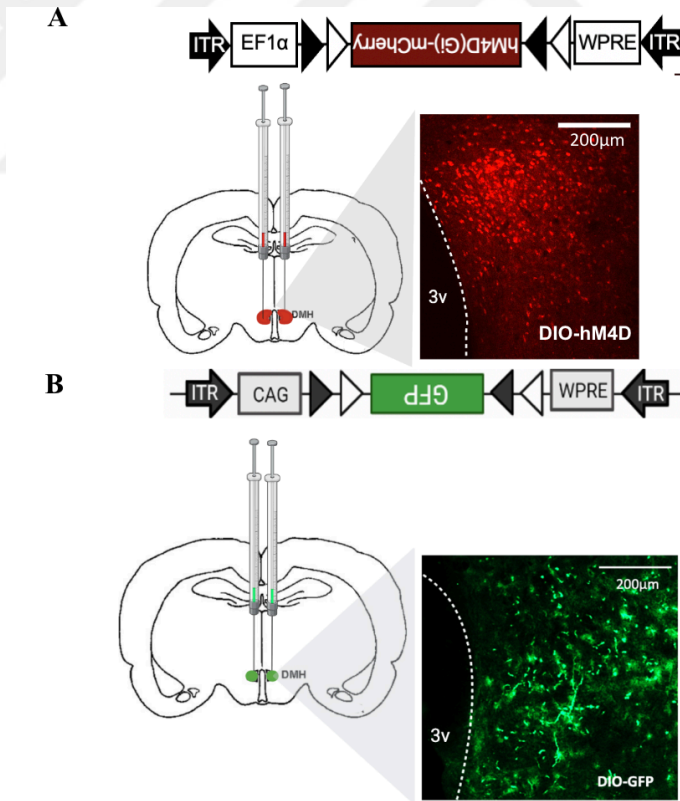


6. BULGULAR

6.1. DMH Nöronlarında Transgen İfadesi

6.1.1. DMH nöronlarında hM4Dq-mCherry transgen ifadesi

Dorsomedial Hipotalamus bölgesinde yer alan GABAerjik nöronlarının termoregülasyon üzerindeki etkinliğinin anlamlandırılabilmesi adına öncelikle buradaki nöronlar kemogenetik metotlar ile inhibe edildi. 8-12 haftalık erkek Vgat-cre farelere intrakraniyal yöntem kullanılarak *rAAV-EF1α-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüs enjeksiyonu yapıldı. İntrakraniyal olarak virüs enjeksiyonları, beynin sağ ve soluna olacak şekilde, önceden doğruluğu tespit edilmiş DMH koordinatlarına gerçekleştirildi. Kontrol grubu için, kemogenetik bir etkinliği olmayan *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsünün enjeksiyonu yapıldı (Şekil 6.1.1.1.).

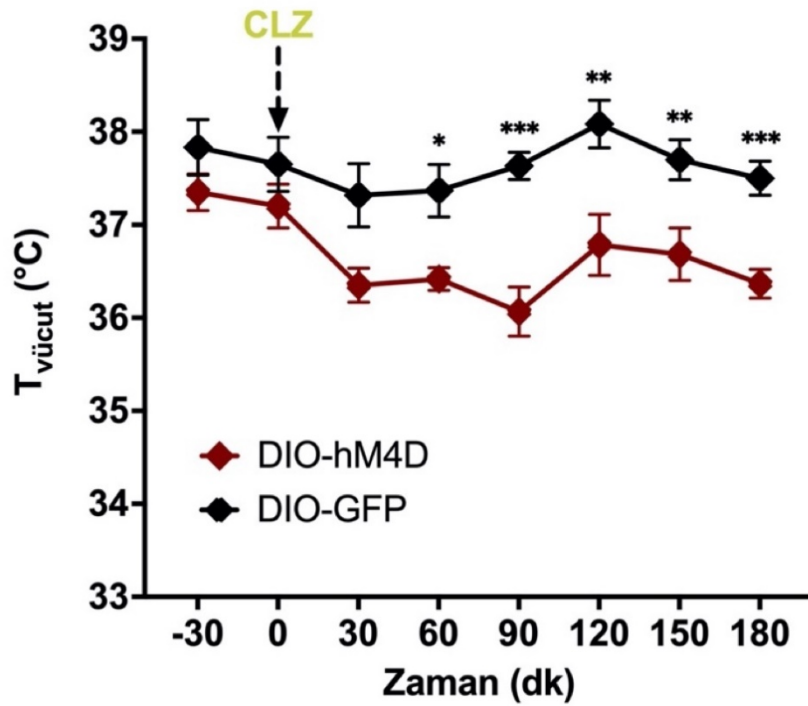


Şekil 6.1.1.1. DMH nöronlarında hM4Dq-mCherry ve GFP transgen ifadesinin gösterilmesi. **A)** DMH^{Vgat2} nöronları *rAAV-EF1α-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* veya **B)** *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsleri ile enfekte edildi.

6.1.2. DMH^{Vgat2} nöronlarının termoregülasyonu üzerindeki etkisi ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi

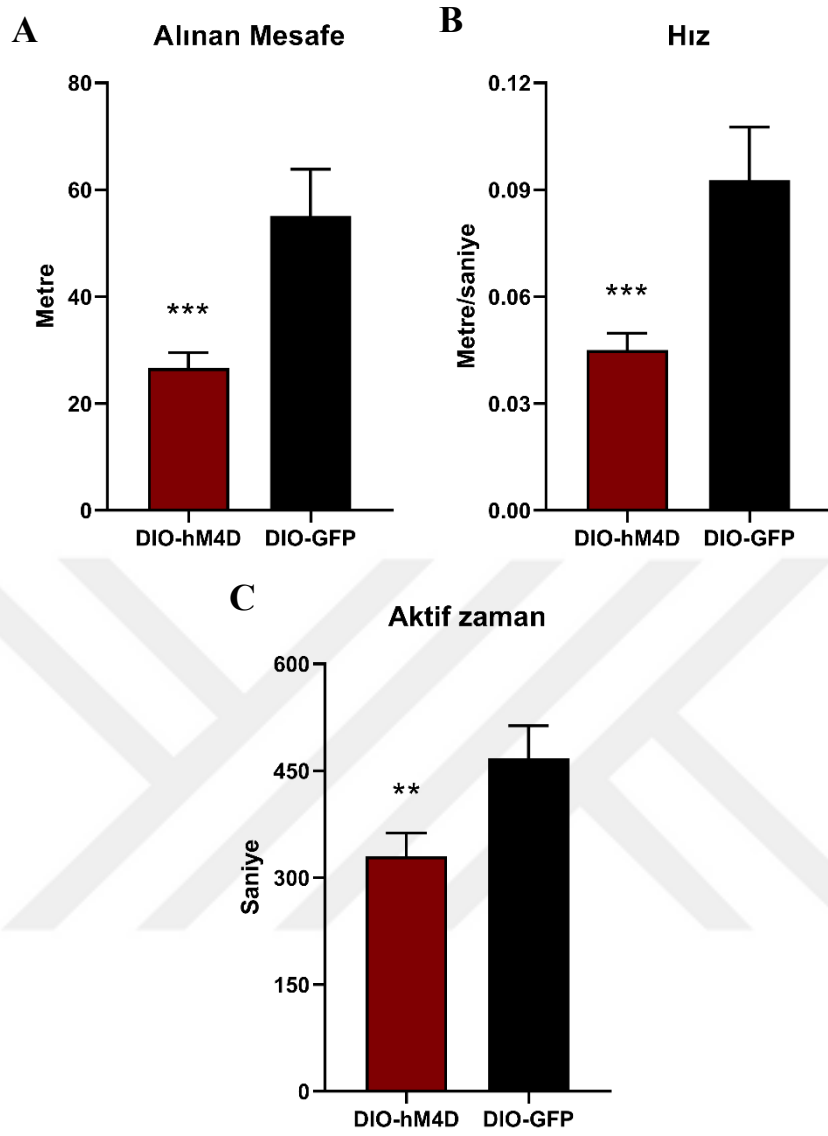
DMH^{Vgat2} nöron inhibisyonunun termoregülasyon üzerinde olan etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla *DIO-hM4D* grubu ve *DIO-GFP* grubu farelere intraperitoneal yöntemle 0,1 mg/kg klozapin enjeksiyonu yapıldı ve DMH nöronlarının inhibisyonu gerçekleştirildi. Ardından termoregülasyon üzerindeki etkinliğe bakmak için farelerin vücut sıcaklıklarına bakıldı ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için açık alan testi uygulandı (Şekil 6.1.2.1., Şekil 6.1.2.2.).

Vücut sıcaklığı takibi



Şekil 6.1.2.1. DMH^{Vgat2} nöron inhibisyonunun termoregülasyon üzerine olan etkisinin gösterilmesi.

rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (n=8) ve *rAAV-CAG-DIO-GFP* (n=6) virüsleri ile enfekte edilen DMH^{Vgat2} nöronlarının bilateral kemogenetik inhibisyonu sonucunda DIO-GFP grubundaki fareler ile kıyaslandığında DIO-hM4D grubundaki farelerin vücut sıcaklıklarının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü (*p<0.05/ **p<0.01/ ***p<0.001).

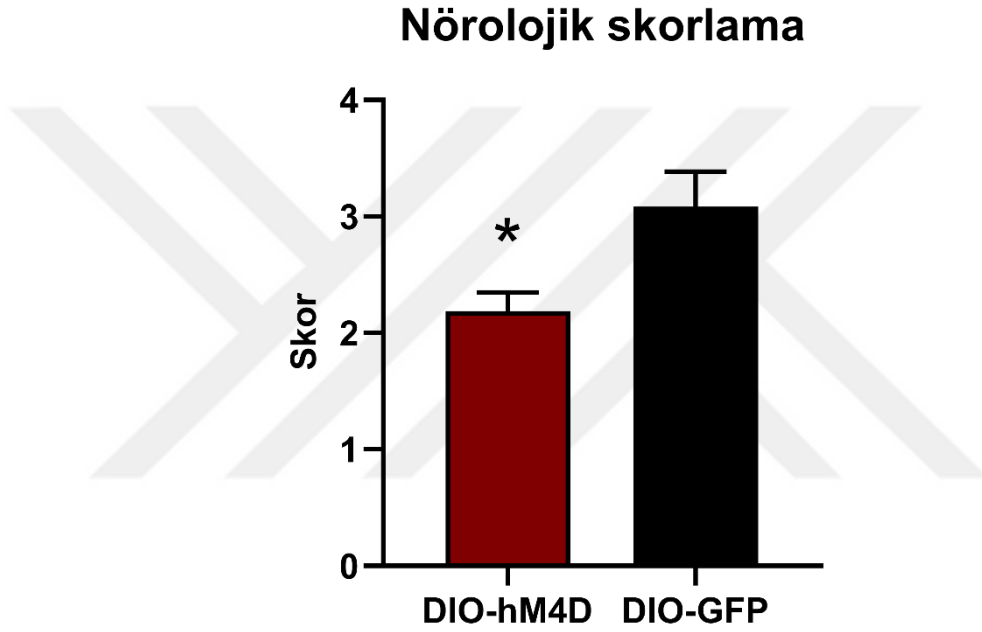


Şekil 6.1.2.2. DMH^{Vgat2} nöron inhibisyonunun lokomotor aktivite üzerine olan etkisi. Açık alan testinde; **A)** alınan mesafe, **B)** hız ve **C)** aktif zaman parametrelerinin değerlendirilmesi.

Çapı 150 cm, yüksekliği 35 cm olan bir alanda fareler 10 dakika süresince izlenmiştir. Anymaze programı kullanılarak silindir alan sanal olarak üç bölüme ayrıldı [115]. Değerlendirme sonucu DIO-hM4D farelerin alınan mesafe, hız ve aktif zaman parametrelerinde DIO-GFP grup farelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu saptandı (**p<0.01/ ***p<0.001).

6.2. Nörolojik Hasar Skoru

Doksan dakikalık iskemik inme modelinde beyindeki hasar korteks bölgesini de içine alacak şekilde bir yayılım göstermekte ve farelerin davranışlarında hasarın miktarına bağlı olarak gözlemlenebilir derecede değişiklikler görülmektedir. 90 dakika orta serebral arteri oklüzyonu modellemesi yapılmış olan fareler 24 saatlik reperfüzyon süresinin ardından sakrifikasyon gerçekleşmeden kısa süre önce nörolojik skorları değerlendirildi (Şekil 6.2.1.).

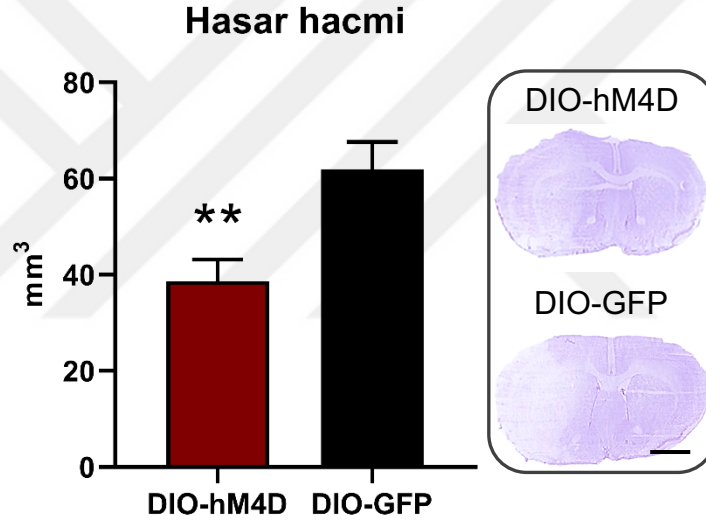


Şekil 6.2.1. Nörolojik hasar skarlaması. 90 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modellemesi sonrası 24 saatlik reperfüzyon bitiminde değerlendirildi. Veri ortalama ± standart hata olarak verildi.

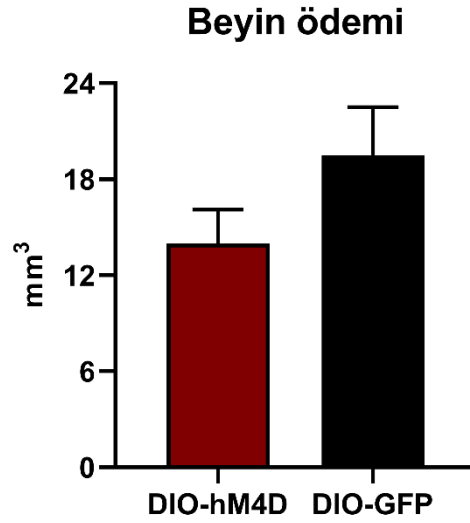
Nörolojik hasar skarlamasına göre farelerin ortalama skorları hesaplandı. Buna göre DIO-hM4D grubu hayvanlarının nörolojik skorunda DIO-GFP hayvanların nörolojik skoruna göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede iyileşme olduğu görüldü (* $p < 0.05$).

6.3. Hasar Hacmi ve Beyin Ödemi Analizi

Doksan dakikalık MCAO modeli uygulanmış hayvanlardan alınan kesitlere beyinlerindeki hasar hacminin ve beyin ödeminin saptanması için Cresyl violet boyaması yapıldı. Bu boyama sayesinde yaşayan doku bölgesindeki endoplazmik retikulumda yer alan nissl cisimcikleri mavi-mor rengine boyanır. Buna karşın yaşamayan doku alanlarında hiçbir renk değişimi görülmez. Boyamanın ardından alınan görüntülemeler Axiozoom mikroskobu ile (Axiozoom V16, Zeiss) gerçekleştirildi. Çekilen görüntülerde hasar ve hasar dışı alanlar ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı ile ölçülerek beyindeki hasar hacmi ve beyin ödemi değerlendirildi (Şekil 6.3.1-2.)



Şekil 6.3.1. Beyindeki hasar hacmi analizi. DIO-hM4D hayvanları ile DIO-GFP hayvanlarının beyin hasar hacmi analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi (** $p < 0.01$) (Bar: 2 mm).



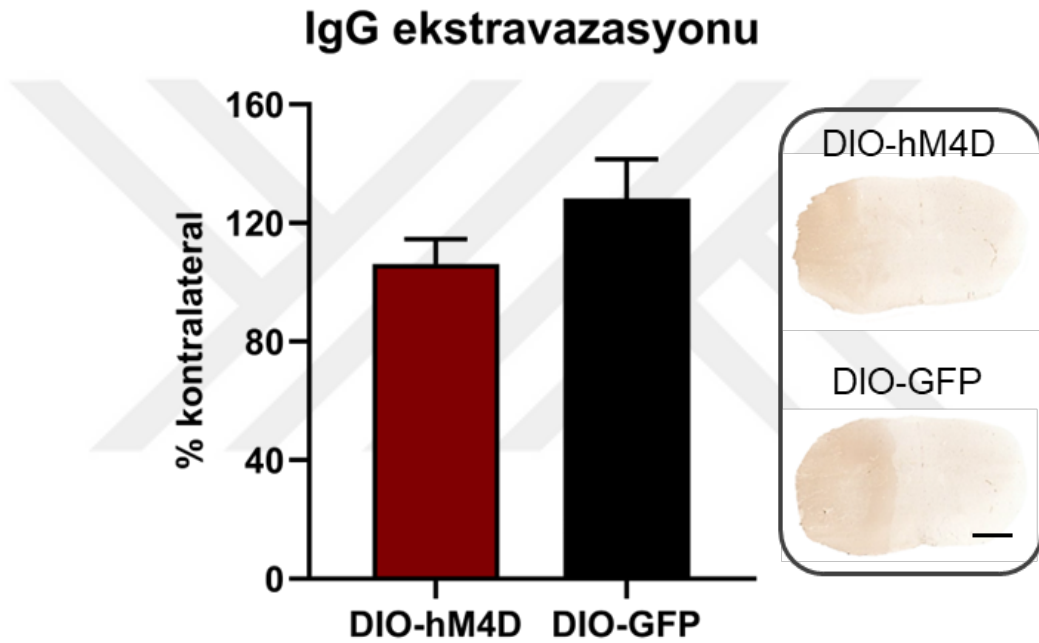
Şekil 6.3.2. Beyindeki ödem hacmi analizi. DIO-hM4D hayvanları ile DIO-GFP hayvanlarının beyin ödemi (%kontralateral) analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi.

DIO-hM4D grubu hayvanlarının beyin hasar hacminin DIO-GFP grubu hayvanlarının beyin hasar hacmine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. DIO-hM4D grubu hayvanlarının beyin ödeminin DIO-GFP grubu hayvanlarının beyin ödeme kıyasla azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

Klozapin (CLZ) ile indüklenen DMH^{Vgat2} nöronlarının kemogenetik inhibisyonu sonrası 90 dakika orta serebral arter oklüzyonu modeli ve 24 saat reperfüzyon yapıldı. Cresyl violet boyamasıyla beyin hasar hacmi ve beyin ödemi incelendi. DMH^{Vgat2} nöronlarının kemogenetik inhibisyonu sonucu indüklenen hipotermi, MCAo sonrası oluşan hasar hacmini *DIO-hM4D* grubunda, *DIO-GFP* grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (** $p<0.01$). Beyin ödeminde ise azalma belirlendi.

6.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Analizi

Doksan dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modellemesi ardından 24 saat reperfüzyon süresi beklenen farelerde kan-beyin bariyeri geçirgenliğini analiz edebilmek adına İmmunoglobulin (IgG) boyaması Vectostain Elite ABC HRP Reagent R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories) kiti kullanılarak yapıldı (**Şekil.6.4.1.**). Boyama bitiminde kan beyin bariyeri geçirgenliğinin analizi Image J programı (National Institute of Health) kullanılarak yapıldı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğindeki bozulma oranı hesaplandı.



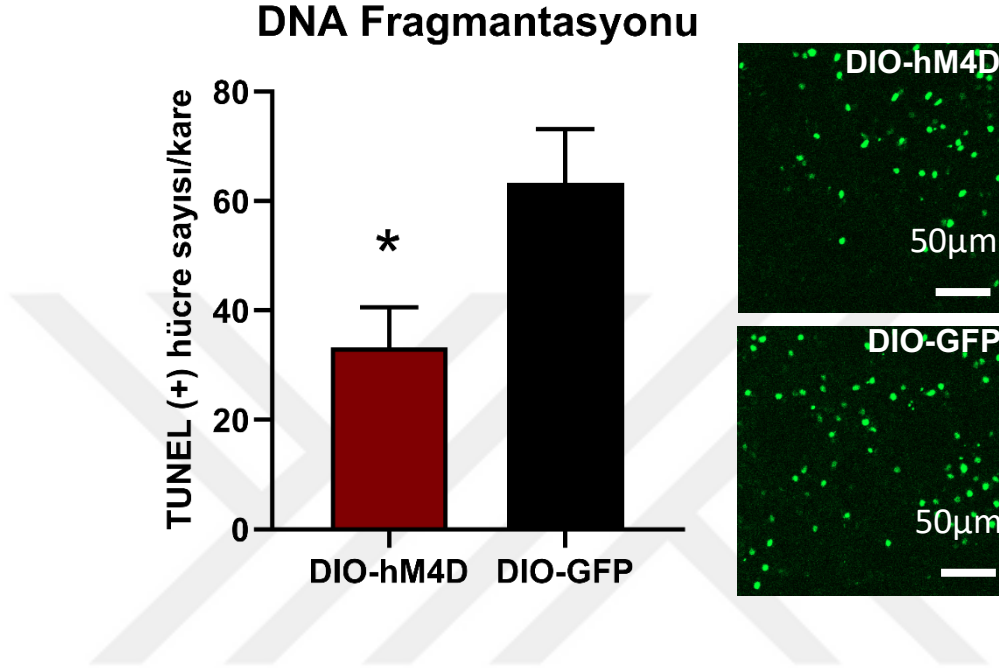
Şekil 6.4.1. Kan beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilmesi.

DIO-hM4D grubu farelerin kan-beyin bariyeri bütünlüğü DIO-GFP grubu farelerinkine kıyasla daha iyi olduğu ancak bu iyi durumun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde olmadığı ($p>0.05$) görüldü (Bar: 2 mm).

6.5. DNA Fragmentasyonu Analizi

Otuz dakika orta serebral arter oklüzyonu modelinin ardından 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin beyin kesitleri, DNA kırıklarının in situ olarak tanınması ve apoptotik olarak hücre ölümü tayininin yapılabilmesi adına TUNEL kiti

(11684795910, Roche) kullanılarak boyandı. Boyama sonunda gerekli değerlendirmelerin yapılabilmesi için iskemik striatumdan dokuz alan belirlendi ve o bölgelerden fotoğraflar alındı. Fotoğraflanan bölgede TUNEL (+) hücreler saptanıp sayımları yapıldı.

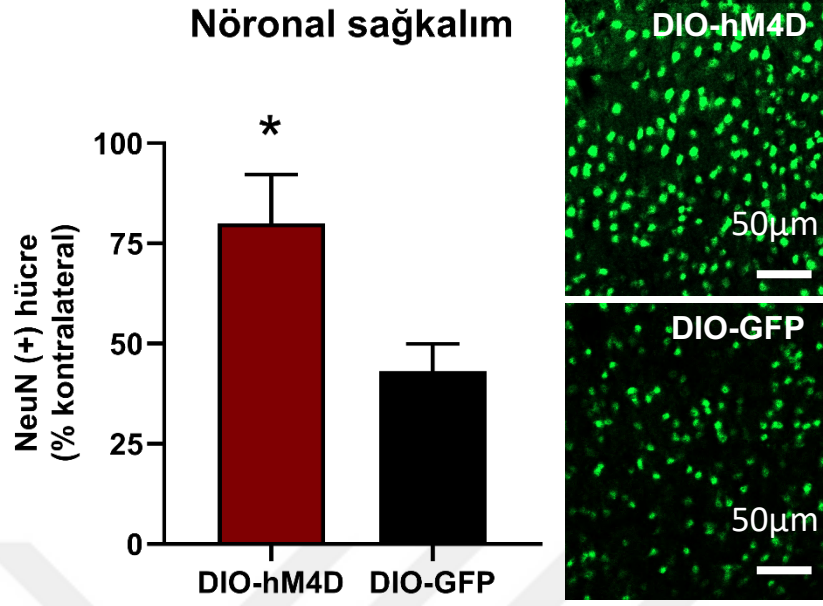


Şekil 6.5.1. TUNEL boyaması ile apoptotik hücre değerlendirilmesi.

Apoptotik hücrelere bakıldığında, DIO-hM4D grubunda DIO-GFP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (* $p < 0.05$). Sonuç olarak DMH^{Vgat2} nöronlarının inhibisyonu iskemi sonrası DNA fragmentasyonunu azalttı.

6.6. Nöronal Sağkalım Analizi

Yaşayan nöronların analizinin yapılabilmesi için striatum bölgesinden gelişigüzel seçilen 62.500 μm^2 'lik 9 bölgede her iki hasarlı ve hasarsız alandaki çekirdek boyaması ile çakışan NeuN (+) hücre sayımı yapıldı.



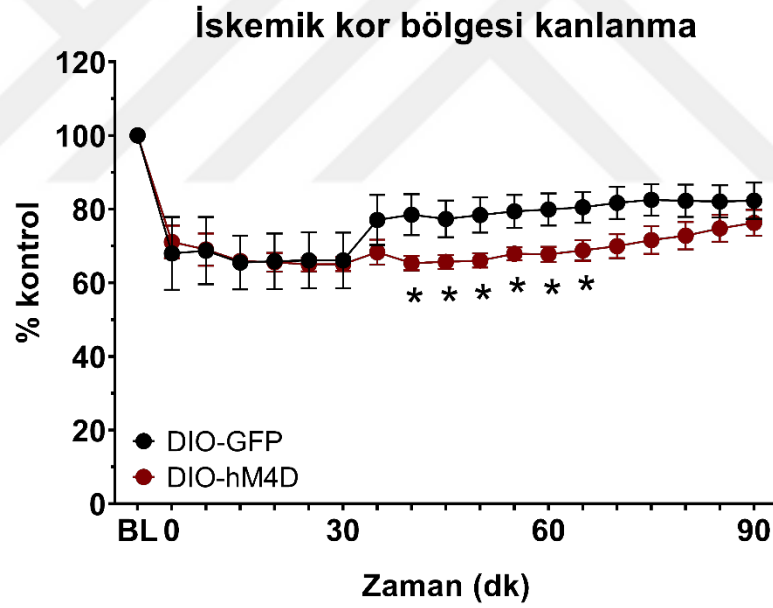
Şekil 6.6.1. Nöronal sağkalımın NeUN boyaması ile değerlendirilmesi.

Nöronal sağkalımın analiz edilebilmesi amacıyla beyin kesitleri -80 °C'den çıkartıldı ve yarım saat oda sıcaklığında kuruması beklendi. Ardından %4'lük PFA solüsyonu ile oda sıcaklığında fiksasyonu gerçekleştirildi. Fiksasyon sonunda kesitler PFA'dan arındırılmak için PBS çözeltisine geçirildi. Kesitlerin oda sıcaklığında yarım saat uygun bloklayıcı solüsyonunda inkübe olması için beklendi. Yarım saatlik bekleminin sonrasında koronal beyin kesitleri NeUN primer antikoru kullanılarak 16 ile 18 saat arasındaki süre zarfında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kesitlerin yıkaması PBS ile yapıldı. Hücre çekirdeğinin saptanabilmesi adına 4',6-diamidino-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) çekirdek boyaması yapıldı. Boyama işlemi bittikten sonra kesitlerin üzeri, uygun bir kapama sıvısı ve lamelle kapatıldı.

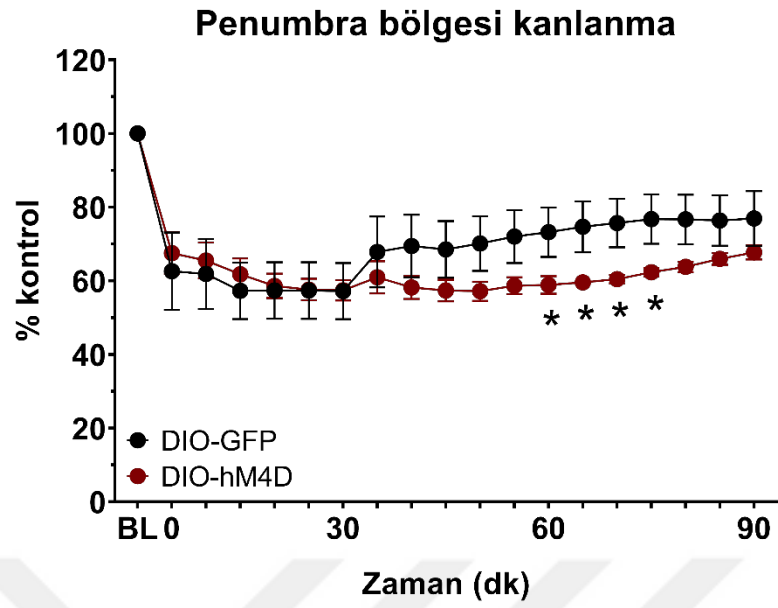
DIO-hM4D ve *DIO-GFP* grupları kıyaslandığında, *DIO-hM4D* grubu hayvanlarının nöronal sağkalımı *DIO-GFP* grubu hayvanlarının nöronal sağkalımına göre daha fazla olduğu gözlemlendi. DMH^{Vgat2} nöronlarının inhibisyonunun nöronal sağkalımı önemli ölçüde arttırdığı belirlendi ($p < 0.05$).

6.7. İskemik Kor, Penumbra ve Hasarsız Korteks Bölgesindeki Kan Akımı

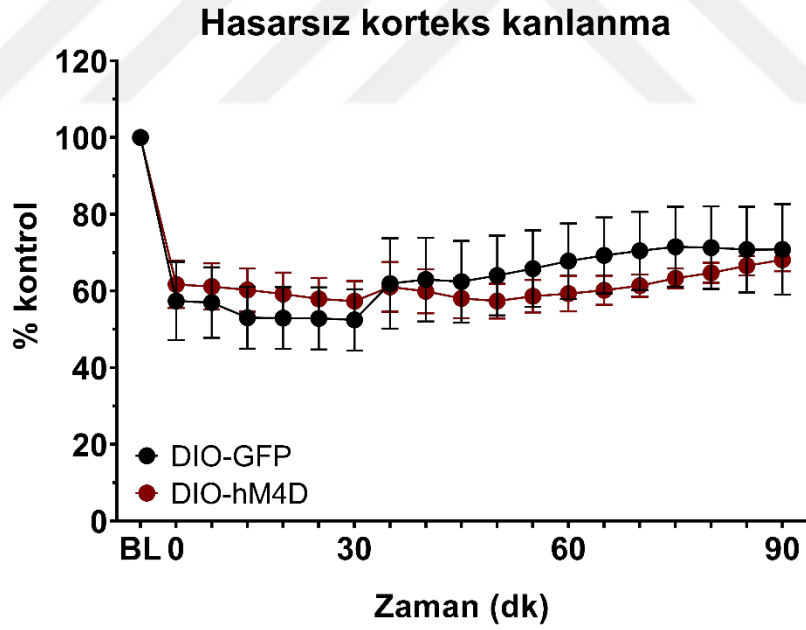
DMH'de bulunan GABAerjik nöronların kemogenetik olarak inhibisyonunun iskemik inme sırasındaki ve sonrasında gerçekleştirilen reperfüzyon esnasındaki beyin kan akımı üzerine etkileri lazer speckle görüntüleme tekniğiyle analiz edilmiştir. Bu amaç için farelere iskemik inme indüklenmeden önce 15 dk süresince (Baseline, BL) kan akımı takibi yapılmıştır. Sonrasında 30 dakika (0-30 arası) iskemik inmenin indüklenmesi ve iskemik inme sonrası 60 dakika (30-90 arası) reperfüzyon sırasında gerçek zamanlı olarak beyin kan akımı takibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ipsilateral hemisferde hem iskemik kor ve iskemik penumbra hem de hasarsız korteks alanlarında *DIO-hM4D* grubundaki kanlanmanın *DIO-GFP* grubu ile kıyaslandığında reperfüzyon sırasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı ardından zaman içerisinde kademeli olarak kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlendi (* $p < 0.05$) (Şekil 6.7.1-3).



Şekil 6.7.1. İskemik kor bölgesindeki kan akımının analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi (* $p < 0.05$).



Şekil 6.7.2. Penumbra bölgesindeki kan akımının analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi (* $p < 0.05$).



Şekil 6.7.3. Hasarsız korteks bölgesindeki kan akımının analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi (* $p < 0.05$).

7. TARTIŞMA

Dorsomedial Hipotalamus bölgesinde yer alan GABAerjik nöronlarının termoregülasyon üzerindeki etkinliğinin anlamlandırılabilmesi adına öncelikle buradaki nöronlar, kemogenetik metotlar ile inhibe edildi. 8-12 haftalık erkek Vgat-cre farelere intrakraniyal yöntem kullanılarak *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüs enjeksiyonu yapıldı. İntrakraniyal olarak virüs enjeksiyonları, beyin sağ ve soluna olacak şekilde, önceden doğruluğu tespit edilmiş DMH koordinatlarına gerçekleştirildi. Kontrol grubu için, kemogenetik bir etkinliği olmayan *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsünün enjeksiyonu yapıldı. DMH nöronlarının kemogenetik olarak inhibe edilmesi için, bilateral olarak, DMH koordinatlarına *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüs enjeksiyonu yapıldı. *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüs enjeksiyonu yapılan fareler kontrol hayvanı olarak değerlendirildi.

İnme dünya çapında ölüm sebebi açısından ikinci sırada bulunur ve inme vakalarının %85'lik kısmı beyni besleyen orta serebral arterin tıkanması ile oluşur. Bu tez çalışmasında da iskemik inme modeli için karmaşık bir patofizyolojiye sahip olan orta serebral arter oklüzyonu modeli uygun görüldü [21]. Bu hedef doğrultusunda farelere 90 ve 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modellemesi yapıldı. Literatürde var olan çalışmalar 90 dakikalık iskemi modelinin özellikle Bederson testi, beyin hasar hacmi, beyin ödemi ve KBB geçirgenliği değerlendirmesi adına uygulanabilir bir metot olduğunu vurgular [116]. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, beyindeki hasar hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin değerlendirilebilmesi için 90 dakikalık MCAo modeli uygulandı. Diğer yandan apoptotik hücrelerin saptanması, nöronal sağkalımın araştırılması ve mikro serebrovasküler kan akışını analiz edebilmek için ise 30 dakikalık MCAo iskemi modeli olarak seçildi. Operasyon boyunca LDF ile beyindeki kan akımı noktasal anlık şekilde izlendi.

Beyinde bulunan Preoptik Alan, vücut ısısı düzenlenmesini kontrol etme amacı ile inhibitör GABAerjik sinyalleri beyin birçok bölgesine gönderir. DMH'de bulunan GABAerjik nöronların inhibisyonu bu yol aracılığı ile inhibe edilir. Bu inhibisyon yoluyla nükleus raphe pallidus'un aktivasyonu gerçekleşir ve böylece sempatik

nöronların uyarımı sağlanır. Nucleus raphe pallidus'un modülasyonu DMH'den gelmiş olan dopaminerjik girdiler tarafından yapılır [117]. Nucleus raphe dorsalis'in inhibisyonu preoptik alan tarafından sağlanır. Sempatik çıktı yükselince, ısı üretimi, kahverengi yağ dokusu katabolizması, ısı kaybının azalması ve periferik damarlarda daralmanın olması gözlenir [92]. POA'daki GABAerjik nöronların termoregülsayon üzerindeki etkileri farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Kimi çalışmalar bu GABAerjik nöronların termoregülasyonu sağladığını desteklerken başka bir grup araştırmacı GABAerjik nöronların termoregülasyonu ile bir ilişkisinin olmadığını savunur. Bu iki zıt savunmanın sebebi, POA'da var olan GABAerjik nöronların çeşitli rol ve farklı fenotiplere sahip alt yollara sahip olması olabilir. Zhao ve arkadaşları yaptığı çalışmalarda, ventrolateral preoptik alanda var olan bir grup GABAerjik nöronun termoregülasyonu indüklediğini ortaya çıkardı. Diğer bir yandan, cFos ekspresyon analizleri, termal bilginin dorsomedial hipotalamusun (DMH) dorsal kısmında bulunan bir grup GABAerjik nöron tarafından da modüle edildiğini ortaya koymuştur. DMH^{Vgat2} nöronların inhibe edilmesi düşük vücut sıcaklığıyla sonuçlanırken aktive edilmesi ile vücut sıcaklığını arttırdığı görülür [9]. *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* ve *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsleri ile enfekte edilen DMH^{Vgat2} nöronlarının bilateral kemogenetik inhibisyonu sonucunda DIO-GFP grubundaki fareler ile kıyaslandığında DIO-hM4D grubundaki farelerin vücut sıcaklıklarının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü (*p<0.05/ **p<0.01/ ***p<0.001).

GABAerjik nöronların aktivasyonunun fiziksel aktivitede artış, inhibisyonunun ise fiziksel aktivitede azalış gösterdiği çalışmalar tarafından ortaya kondu [9]. *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* ve *rAAV-CAG-DIO-GFP* virüsleri ile enfekte edilen DMH^{Vgat2} nöronlarının bilateral kemogenetik inhibisyonu sonucunda lokomotor aktivite değerlendirmesi yapıldı. Çapı 150 cm, yüksekliği 35 cm olan bir alanda fareler 10 dakika süresince izlendi. Anymaze programı kullanılarak silindir alan sanal olarak üç bölüme ayrıldı. Değerlendirme sonucu DIO-hM4D farelerin alınan mesafe, hız ve aktif zaman parametrelerinde DIO-GFP grup farelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu saptandı (**p<0.01/ ***p<0.001).

Akut iskemi geçirmiş hayvanlarda motor kortekse kadar çıkan hasar sebebi ile bazı işlevsel bozukluk ve kayıplarla karşılaşıldığı bilinir. Karşılaşılan bu motor işlevsel bozukluk ve kayıpların Bederson testi ile yapılan nörolojik skorlama ile tespit edilebildiğı çalışmalar yoluyla görülmüştür [118]. Elde edilen nörolojik yanıtlara dayanarak, belirlenen skorlama sistemi ile nörolojik durum değeriendirilir. Yapılan bu skorlama, beyin hasarının sebep olduğı işlevsel kayıpların boyutunu anlamaya yardımcı olur. Farelerdeki 90 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modellemesinin 24 saat sonrasında, hayvanların sakrifiye edilmesinden hemen öncesi fareler Bederson testine göre nörolojik olarak skorlandı. Bu skorlama göz önüne alındığında DIO-hM4D grubu hayvanların nörolojik durumlarının DIO-GFP grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi olduğı gözlemlendi (* $p<0.05$). Hipotermi indüklenen DIO- hM4D grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa dahi nörolojik iyileşmenin görülməsi, oluşan hipotermiinin orta serebral arter oklüzyonu sonucu meydana gelen hasar alanını azaltması ile ilişkili olduğı düşündürdü.

Literatürde terapötik hipotermi ve hasar alanı ile ilişki çalışmalara gözetildiğine, iskemik hasar geçiren ve hipotermi ile tedavisi sağlanan kişilerde hasar hacminin azaldığı saptandı [119]. Farklı türlerdeki hayvanların içinde bulunduğı inme modellerinde yapılan hipotermi çalışmaları, hipotermiinin enfarktüs boyutunda azalma gerçekleştirilmesi açısından nöroprotektif olduğunu gösterdi [120]. Beyin felci sonrasında gelişen enfarktüs hacmi ve beyin ödeminin analizi için 90 dk MCAo takiben 24 saat reperfüzyon uygulanan farelerden alınan beyin kesitlerine cresyl violet boyaması gerçekleştirildi [121]. Yapılan cresyl violet boyamasının sonucunda, DIO-hM4D grubundaki hayvanların beyin hasar hacmi, DIO-GFP grubu hayvanlarının beyin hasar hacmine kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı görülürken (** $p<0.01$), DIO-hM4D grubu DIO-GFP grubuna göre kıyaslandığında, beyin ödeminde anlamlı derecede olmasa da azalmış bir trend yakalandı.

Apoptoz, hipotermiden yüksek derecede etkilenir [122]. Hipotermiinin nöronal apoptozu, mitokondriyal olarak içsel ve reseptör aracılı dışsal olmak kaydıyla iki yol üzerinde inhibe ettiğı ortaya çıkmıştır [123]. Yapılan alışmalar, iskemik beyin hasarında apoptoz oluşumunun hipotermi ile azaldığını ileri sürer [124]. Hipotermiinin

apoptoz gibi çeşitli iskemik hücre ölüm yollarını da olumlu yönde etkilediği gösterildi. Birkaç çalışma, hipoterminin inme modellerinde apoptotik hücre ölümünü önleyebileceğini gösterdi. Kısaca terapötik hipotermi, hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak birçok hücre ölüm yolunu etkileme yeteneğine sahiptir [125]. Histokimyasal bir teknik olan TUNEL boyama, hücre apoptozunu tespit etmek ve DNA kırıklarının in situ olarak saptamak adına kullanılır. 30 dakika orta serebral arter oklüzyonu modelinin ardından 72 saat reperfüzyon uygulanan farelerin beyin kesitleri, DNA kırıklarının in situ olarak tanınması ve apoptotik olarak hücre ölümü tayininin yapılabilmesi için TUNEL kiti kullanılarak boyandı ve apoptotik hücre tespiti yapıldı. Yapılan analiz sonucu apoptotik hücreler karşılaştırıldığında, DIO-hM4D grubunda DIO-GFP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (* $p < 0.05$). Yani DMH^{Vgat2} nöronlarının inhibisyonu iskemi sonrası DNA fragmentasyonunda azalmaya neden oldu.

Çalışmalar terapötik hipoterminin uygulanan modellerde nöroproteksiyon için çok yönlü etkilere neden olduğunu gösterdi [104]. Uzun süredir terapötik hipoterminin beyin metabolizmasını yavaşlatarak faydalı etkilere yol açtığı düşünülüyordu ancak yapılan çok sayıda araştırma ile, terapötik hipoterminin beyin metabolizmasının düzenlenmesi de dahil olmak üzere çok çeşitli patolojik yolları olumlu yönde değiştirerek nöroproteksiyon uyguladığı kabul edildi [126, 127]. Diğer bir taraftan nöronal sağkalımın anlaşılabilmesi iskemi de dahil birçok beyin hasarına yönelik tedavi yöntemleri geliştirmek ve hasar sonrası etkileri hafifletmek için oldukça önemlidir. Serebral iskeminin ardından nöronal sağkalımın artması yönünde yapılan araştırmaların amacı da beyin fonksiyonların korunmasıdır. Kemogenetik yöntemler ile oluşan hipoterminin serebral iskemi sonrası nöronal sağkalımdaki etkisine bakabilmek ve sağlam nöronların analizini yapabilmek için striatum bölgesinde seçilen 9 bölgede her iki hasarlı ve hasarsız alandaki çekirdek boyaması ile çıkan NeuN(+) hücre sayımı yapıldı. Yapılan hücre sayımı kıyaslanmasının sonucunda DIO-hM4D grubu hayvanlarının DIO-GFP grup hayvanlarının nöronal sağ kalımına göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu gözlemlendi (* $p < 0.05$). Yani DMH^{Vgat2} nöronlarının inhibisyonunun nöronal sağkalımı önemli ölçüde arttırdığı belirlendi.

Hipoterminin serebral damar sisteminin kendi düzenlenmesini korumaya alarak sitotoksik ödemi azalttığı, yeterli gelmeyen beyindeki perfüzyon basıncından veya herniasyonla birlikte mekanik baskılardan kaynaklanan bölgelerde ikincil hasarı en aza indirdiği yapılan çalışmalar tarafından gösterildi. İskemi sonrası hızla artan kan basıncı, sekonder bir iskemik atağa sebep olabildiği biliniyor [128, 129]. Farelere 30 dakikalık iskemik modeli uygulanmaya başladı ve Lazer Speckle cihazı ile bölgesel kan akımı takibi yapıldı. 30 dakika MCAo indüklenen farelerin kortikal kan akımları lazer speckle cihazı ile takip edildi. İnceleme için hasar alanı üç bölgeye ayrıldı. Nekrotik hücre kaybının yaşandığı ve kan akımının sıfırlandığı kor bölgesi, kor bölgesinden daha iyi kan akımı gerçekleşen ve apoptotik hücre ölümlerinin yaşandığı penumbra bölgesi, son olarak ise hasarsız korteks bölgesi. Operasyon öncesi 15 dakika kayıt alındı ve ardından 30 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modeli gerçekleştirildi. Kayıt reperfüzyon boyunca devam etti. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ipsilateral hemisferde hem iskemik kor ve iskemik penumbra hem de hasarsız korteks alanlarında *DIO-hM4D* grubundaki kanlanmanın *DIO-GFP* grubuna göre reperfüzyon sırasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı ardından zaman içerisinde kademeli olarak kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlendi (* $p<0.05$). Bulduğumuz sonuçlar, hipotermi indüklenmiş *DIO-hM4D* grubu hayvanlarının reperfüzyon sırasında kanlanmanın ani bir artış yerine önce azalıp sonra kademeli olarak artmasıydı ve bu durum bize hipoterminin ikincil hasarı önleme mekanizmasından kaynaklandığını düşündürdü.

Kan beyin bariyerinin dolaşımında yer alan kanın içeriğinde var olan büyük moleküllerin beyne girişine müsaade etmeyerek homeostazise yardımcı olma özelliği vardır. Akut fokal iskemik sonucunda KBB hasar görür ve böylece beyindeki inflamasyon yanıtı artar. Deneysel iskemik beyin hasarını azaltmak için hipoterminin en güçlü terapötik yaklaşım olduğu öne sürülmüştür ve nörovasküler cerrahi sırasında nöroproteksiyon amacıyla hipotermi tedavisi kullanımı artar. Hafif ila orta dereceli hipoterminin deneysel fokal inmenin ardından [130] rtPA ile ilişkili kanamada [131] mikrovasküler bazal lamina antijen kaybını önlediği ve rtPA tedavisini takiben hasar hacmini ve KBB yıkımını azalttığı görüldü. 90 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu modellemesi ardından 24 saat reperfüzyon süresi beklenen farelerde kan-beyin

bariyeri geçirgenliğini analiz edebilmek adına IgG boyaması yapıldı. Boyama bitiminde kan beyin bariyeri geçirgenliğinin analizi Image J programı (National Institute of Health) kullanılarak ipsilateral hemisferin kontralateral hemisfere olan oranı hesaplanarak gerçekleştirildi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğindeki bozulma oranı elde edildi. DIO-hM4D grubu farelerin kan-beyin bariyeri bütünlüğü DIO-GFP grubu farelerinkine kıyasla daha iyi olduğu ancak bu iyi durumun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde olmadığı ($p>0.05$) görüldü.



8. SONUÇ

Bu çalışma farelerde gerçekleştirilen akut inmede nöroprotektif etki yaratmak için terapötik hipotermiyi indükleyip, dorsomedial hipotalamusta (DMH) bulunan bir nöronal alt popülasyonu belirlemek amacı ile yapıldı. Bu amaç doğrultusunda Dorsomedial Hipotalamus bölgesinde yer alan GABAerjik nöronlarının termoregülasyon üzerindeki etkinliğinin anlamlandırılabilmesi adına buradaki nöronlar, kemogenetik metotlar ile uyarıldı ve sonrasında serebral iskemi modeli uygulandı. Ardından farelerdeki, nörolojik durum, hasar hacmi, beyin ödemi, kan beyin bariyeri geçirgenliği, apoptotik hücre miktarı, nöronal sağkalım ve serebral kan akımı incelemesi yapıldı.

Sonuç olarak, kemogenetik yöntemle hipotermi indüklenen DIO-hM4D grubu hayvanlarda hasar hacmi, beyin ödemi ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin, aynı zamanda apoptotik hücre sayısının azaldığı, nöronal sağkalımın ise arttığı görüldü. Tam tersi hipotermi indüklenmemiş ve terapötik etki beklenmeyen DIO-GFP grup hayvanlarında ise beyinde artan hasar hacmi, ödem, kan-beyin bariyer geçirgenliği, artmış apoptotik hücre ölümü ve azalan nöronal sağkalım görüldü. Bu bulgular, DMH^{Vgat2} nöronlarının kemogenetik inhibisyonunun farelerin vücut sıcaklığını düşürdüğünü ve akut iskemi için tedavi edici etkilerinin olduğunu gösterdi.

9. KAYNAKLAR

1. Saini, V., L. Guada, and D.R. Yavagal, *Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions*. Neurology, 2021. **97**(20 Supplement 2): p. S6-S16.
2. Wang, H., et al., *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. The lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
3. Bailey, E.L., et al., *Pathology of lacunar ischemic stroke in humans—a systematic review*. Brain pathology, 2012. **22**(5): p. 583-591.
4. Li, J., et al., *The role of hypothermia in large hemispheric infarction: a systematic review and meta-analysis*. Frontiers in Neurology, 2020. **11**: p. 549872.
5. Imai-Matsumura, K. and T. Nakayama, *The central efferent mechanism of brown adipose tissue thermogenesis induced by preoptic cooling*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(6): p. 1299-303.
6. Choi, J.H. and J. Pile-Spellman, *Selective brain hypothermia*. Handbook of clinical neurology, 2018. **157**: p. 839-852.
7. Labbé, S.M., et al., *Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis*. Front Syst Neurosci, 2015. **9**: p. 150.
8. Mohammed, M., et al., *Preoptic area cooling increases the sympathetic outflow to brown adipose tissue and brown adipose tissue thermogenesis*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018. **315**(4): p. R609-r618.
9. Zhao, Z.D., et al., *A hypothalamic circuit that controls body temperature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(8): p. 2042-2047.
10. Campbell, B.C., et al., *Ischaemic stroke*. Nature reviews Disease primers, 2019. **5**(1): p. 70.
11. Obrenovitch, T.P., et al., *Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischaemia: comparison between penumbral conditions and ischaemia with sustained anoxic depolarisation*. Journal of neurochemistry, 1993. **61**(1): p. 178-186.
12. Nowak, L., et al., *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 462-465.
13. Mayer, M.L. and R.J. Miller, *Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons*. Trends in pharmacological sciences, 1990. **11**(6): p. 254-260.
14. Wu, Q.J. and M. Tymianski, *Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection*. Molecular brain, 2018. **11**: p. 1-14.
15. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
16. Tarassishin, L., H.S. Suh, and S.C. Lee, *LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14*. Glia, 2014. **62**(6): p. 999-1013.
17. Raghavendra Rao, V.L., K.K. Bowen, and R.J. Dempsey, *Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain*. Neurochemical research, 2001. **26**: p. 497-502.

18. Mestre, H., et al., *Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling*. Science, 2020. **367**(6483): p. eaax7171.
19. Kirov, S.A., I.V. Fomitcheva, and J. Sword, *Rapid neuronal ultrastructure disruption and recovery during spreading depolarization-induced cytotoxic edema*. Cerebral Cortex, 2020. **30**(10): p. 5517-5531.
20. Dreier, J.P. and C. Reiffurth, *Exploitation of the spreading depolarization-induced cytotoxic edema for high-resolution, 3D mapping of its heterogeneous propagation paths*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(9): p. 2112-2114.
21. Dreier, J.P., *The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease*. Nature medicine, 2011. **17**(4): p. 439-447.
22. Andrew, R.D., et al., *Physiological evidence that pyramidal neurons lack functional water channels*. Cerebral Cortex, 2007. **17**(4): p. 787-802.
23. Hellas, J.A. and R.D. Andrew, *Neuronal swelling: a non-osmotic consequence of spreading depolarization*. Neurocritical Care, 2021. **35**(2): p. 112-134.
24. Woitzik, J., et al., *Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke*. Neurology, 2013. **80**(12): p. 1095-1102.
25. Strong, A.J., et al., *Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex*. Brain, 2007. **130**(4): p. 995-1008.
26. Dreier, J.P. and C. Reiffurth, *The stroke-migraine depolarization continuum*. Neuron, 2015. **86**(4): p. 902-922.
27. Bogdanov, V.B., et al., *Susceptibility of primary sensory cortex to spreading depolarizations*. Journal of Neuroscience, 2016. **36**(17): p. 4733-4743.
28. Aitken, P., et al., *Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons*. Pflügers Archiv, 1998. **436**(6): p. 991-998.
29. Dobretsov, M. and J.R. Stimers, *Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase*. Front Biosci, 2005. **10**(1-3): p. 2373-2396.
30. Czéh, G., P.G. Aitken, and G.G. Somjen, *Whole-cell membrane current and membrane resistance during hypoxic spreading depression*. Neuroreport, 1992. **3**(2): p. 197-200.
31. Czéh, G., P.G. Aitken, and G.G. Somjen, *Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization*. Brain research, 1993. **632**(1-2): p. 195-208.
32. Vincent, P. and C. Mulle, *Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity*. Neuroscience, 2009. **158**(1): p. 309-323.
33. Lipton, S.A., *NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways*. Nature neuroscience, 2008. **11**(4): p. 381-382.
34. Chen, C.J., S.L. Liao, and J.S. Kuo, *Glutotoxic action of glutamate on cultured astrocytes*. Journal of neurochemistry, 2000. **75**(4): p. 1557-1565.
35. Watkins, B., S. Petersen, and P. Ryan, *Interactions between seabirds and deep-water hake trawl gear: an assessment of impacts in South African waters*. Animal conservation, 2008. **11**(4): p. 247-254.
36. Okubo, Y., et al., *Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain*. Neuroscience Research, 2009(65): p. S142-S143.
37. Spandou, E., et al., *Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage*. Reproductive sciences, 2007. **14**(7): p. 667-677.

38. Nicholls, D., *Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures*. Current molecular medicine, 2004. **4**(2): p. 149-177.
39. Farooqui, T. and A.A. Farooqui, *Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Mechanisms of ageing and development, 2009. **130**(4): p. 203-215.
40. Belur, P.K., et al., *Emerging experimental therapies for intracerebral hemorrhage: targeting mechanisms of secondary brain injury*. Neurosurgical focus, 2013. **34**(5): p. E9.
41. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2015. **10**: p. 173-194.
42. Forrester, S.J., et al., *Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling*. Circulation research, 2018. **122**(6): p. 877-902.
43. Malik, A.R. and T.E. Willnow, *Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(22): p. 5671.
44. Nayernia, Z., V. Jaquet, and K.-H. Krause, *New insights on NOX enzymes in the central nervous system*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(17): p. 2815-2837.
45. Alfonso-Loeches, S., et al., *Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells*. Frontiers in cellular neuroscience, 2014. **8**: p. 216.
46. Dal-Cim, T., et al., *Guanosine prevents oxidative damage and glutamate uptake impairment induced by oxygen/glucose deprivation in cortical astrocyte cultures: Involvement of A 1 and A 2A adenosine receptors and PI3K, MEK, and PKC pathways*. Purinergic signalling, 2019. **15**: p. 465-476.
47. Haskew-Layton, R.E., et al., *Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(40): p. 17385-17390.
48. Ma, X., et al., *Lipoic acid: an immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 5086-5092.
49. Massaad, C.A. and E. Klann, *Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **14**(10): p. 2013-2054.
50. Yang, S. and G. Lian, *ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply*. Molecular and cellular biochemistry, 2020. **467**: p. 1-12.
51. Nathan, C. and A. Cunningham-Bussel, *Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(5): p. 349-361.
52. Tejero, J., S. Shiva, and M.T. Gladwin, *Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation*. Physiological reviews, 2019. **99**(1): p. 311-379.
53. Lopez-Fabuel, I., et al., *Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(46): p. 13063-13068.
54. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annual review of immunology, 1994. **12**(1): p. 991-1045.
 55. Alexander, S.P., et al., *The concise guide to pharmacology 2021/22: Catalytic receptors*. British Journal of Pharmacology, 2021. **178**: p. S264-S312.
 56. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nature immunology, 2010. **11**(5): p. 373-384.
 57. Caso, J.R., et al., *Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1599-1608.
 58. Urra, X., et al., *Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke*. Stroke, 2009. **40**(4): p. 1262-1268.
 59. Zera, K.A. and M.S. Buckwalter, *The local and peripheral immune responses to stroke: implications for therapeutic development*. Neurotherapeutics, 2020. **17**(2): p. 414-435.
 60. Hu, X., et al., *Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia*. Stroke, 2012. **43**(11): p. 3063-3070.
 61. Iadecola, C., M.S. Buckwalter, and J. Anrather, *Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential*. The Journal of clinical investigation, 2020. **130**(6): p. 2777-2788.
 62. Mastorakos, P., et al., *Temporally distinct myeloid cell responses mediate damage and repair after cerebrovascular injury*. Nature neuroscience, 2021. **24**(2): p. 245-258.
 63. Liu, Z. and M. Chopp, *Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke*. Progress in neurobiology, 2016. **144**: p. 103-120.
 64. Choudhury, G.R. and S. Ding, *Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke*. Neurobiology of disease, 2016. **85**: p. 234-244.
 65. Ben Haim, L., et al., *Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases*. Frontiers in cellular neuroscience, 2015. **9**: p. 278.
 66. Sofroniew, M.V., *Reactive astrocytes in neural repair and protection*. The Neuroscientist, 2005. **11**(5): p. 400-407.
 67. Gelderblom, M., et al., *Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke*. Stroke, 2009. **40**(5): p. 1849-1857.
 68. Gill, D., et al., *Temporal trends in the levels of peripherally circulating leukocyte subtypes in the hours after ischemic stroke*. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2018. **27**(1): p. 198-202.
 69. Tan, C.L. and Z.A. Knight, *Regulation of body temperature by the nervous system*. Neuron, 2018. **98**(1): p. 31-48.
 70. Jessen, C. and O. Ludwig, *Spinal cord and hypothalamus as core sensors of temperature in the conscious dog: II. Addition of signals*. Pflügers Archiv, 1971. **324**: p. 205-216.
 71. Romanovsky, A.A., et al., *The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not*. Pharmacological reviews, 2009. **61**(3): p. 228-261.

72. Hensel, H., *Neural processes in thermoregulation*. Physiological reviews, 1973. **53**(4): p. 948-1017.
73. Kanosue, K., et al., *Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works*. European journal of applied physiology, 2010. **109**: p. 5-11.
74. Walters, T., et al., *Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature*. Journal of applied physiology, 2000.
75. Fuller, A., R.N. Carter, and D. Mitchell, *Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat*. Journal of Applied Physiology, 1998. **84**(3): p. 877-883.
76. Jessen, C., *Thermal afferents in the control of body temperature*. Pharmacology & therapeutics, 1985. **28**(1): p. 107-134.
77. Terrien, J., M. Perret, and F. Aujard, *Behavioral thermoregulation in mammals: a review*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**(4): p. 1428-44.
78. Shelton, D.S. and J.R. Alberts, *Development of behavioral responses to thermal challenges*. Developmental psychobiology, 2018. **60**(1): p. 5-14.
79. Batchelder, P., et al., *Effects of temperature and social interactions on huddling behavior in Mus musculus*. Physiology & behavior, 1983. **31**(1): p. 97-102.
80. Liu, L. and M.A. Yenari, *Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms*. Front Biosci, 2007. **12**(12): p. 816-25.
81. Hammer, M.D. and D.W. Krieger, *Hypothermia for acute ischemic stroke: not just another neuroprotectant*. The neurologist, 2003. **9**(6): p. 280-289.
82. Wit, A. and S. Wang, *Temperature-sensitive neurons in preoptic-anterior hypothalamic region: effects of increasing ambient temperature*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1968. **215**(5): p. 1151-1159.
83. Siemens, J. and G.B. Kamm, *Cellular populations and thermosensing mechanisms of the hypothalamic thermoregulatory center*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2018. **470**: p. 809-822.
84. Osborne, P.G. and M. Kurosawa, *Perfusion of the preoptic area with muscimol or prostaglandin E2 stimulates cardiovascular function in anesthetized rats*. Journal of the autonomic nervous system, 1994. **46**(3): p. 199-205.
85. Tanaka, M., M.J. McKinley, and R.M. McAllen, *Preoptic-raphé connections for thermoregulatory vasomotor control*. Journal of Neuroscience, 2011. **31**(13): p. 5078-5088.
86. Tan, C.-H. and P.A. McNaughton, *The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth*. Nature, 2016. **536**(7617): p. 460-463.
87. Yu, S., et al., *Glutamatergic preoptic area neurons that express leptin receptors drive temperature-dependent body weight homeostasis*. Journal of Neuroscience, 2016. **36**(18): p. 5034-5046.
88. Conceição Furber, E.P., et al., *Dopaminergic input from the posterior hypothalamus to the raphe pallidus area inhibits brown adipose tissue thermogenesis*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2021. **321**(6): p. R938-R950.
89. Kerman, I.A., H. Akil, and S.J. Watson, *Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study*. Journal of Neuroscience, 2006. **26**(13): p. 3423-3433.

90. Cerri, M., et al., *Cutaneous vasodilation elicited by disinhibition of the caudal portion of the rostral ventromedial medulla of the free-behaving rat*. Neuroscience, 2010. **165**(3): p. 984-995.
91. Rusyniak, D.E., et al., *3, 4-Methylenedioxymethamphetamine-and 8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin-induced hypothermia: role and location of 5-hydroxytryptamine 1A receptors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2007. **323**(2): p. 477-487.
92. Petroianu, G.A., *Hyperthermia and Serotonin: The Quest for a "Better Cyproheptadine"*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(6): p. 3365.
93. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2007.
94. van der Lans, A.A., et al., *Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(8): p. 3395-3403.
95. Vosselman, M.J., et al., *Brown adipose tissue activity after a high-calorie meal in humans*. The American journal of clinical nutrition, 2013. **98**(1): p. 57-64.
96. Vitali, A., et al., *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes*. Journal of lipid research, 2012. **53**(4): p. 619-629.
97. Wu, J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, *Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?* Genes & development, 2013. **27**(3): p. 234-250.
98. Jeong, J.H., et al., *Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate mouse brown adipose tissue metabolism*. Molecular metabolism, 2015. **4**(6): p. 483-492.
99. Evenson, K.R., et al., *A comprehensive review of prehospital and in-hospital delay times in acute stroke care*. International Journal of Stroke, 2009. **4**(3): p. 187-199.
100. Lacy, C.R., et al., *Delay in presentation and evaluation for acute stroke: Stroke Time Registry for Outcomes Knowledge and Epidemiology (STROKE)*. Stroke, 2001. **32**(1): p. 63-69.
101. Chen, Z., et al., *Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke: a combined analysis of 40 000 randomized patients from the Chinese Acute Stroke Trial and the International Stroke Trial*. Stroke, 2000. **31**(6): p. 1240-1249.
102. Fonarow, G.C., et al., *Door-to-needle times for tissue plasminogen activator administration and clinical outcomes in acute ischemic stroke before and after a quality improvement initiative*. Jama, 2014. **311**(16): p. 1632-1640.
103. Virani, S.S., et al., *Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2020. **141**(9): p. e139-e596.
104. Choi, H.A., N. Badjatia, and S.A. Mayer, *Hypothermia for acute brain injury—mechanisms and practical aspects*. Nature Reviews Neurology, 2012. **8**(4): p. 214-222.
105. Yenari, M.A. and T.M. Hemmen, *Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go?* Stroke, 2010. **41**(10_suppl_1): p. S72-S74.

106. Nielsen, N., et al., *Targeted temperature management at 33 C versus 36 C after cardiac arrest*. New England journal of medicine, 2013. **369**(23): p. 2197-2206.
107. Yanamoto, H., et al., *Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats*. Stroke, 1999. **30**(12): p. 2720-2726.
108. Shimohata, T., H. Zhao, and G.K. Steinberg, *ϵ PKC may contribute to the protective effect of hypothermia in a rat focal cerebral ischemia model*. Stroke, 2007. **38**(2): p. 375-380.
109. Bratincsák, A. and M. Palkovits, *Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure*. Neuroscience, 2004. **127**(2): p. 385-97.
110. Shackelford, R.T. and S.A. Hegedus, *Factors affecting cerebral blood flow--experimental review: sympathectomy, hypothermia, CO₂ inhalation and pavarine*. Annals of Surgery, 1966. **163**(5): p. 771.
111. Todd, M.M., et al., *Mild intraoperative hypothermia during surgery for intracranial aneurysm*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(2): p. 135-145.
112. Ziganshin, B.A. and J.A. Elefteriades, *Deep hypothermic circulatory arrest*. Annals of cardiothoracic surgery, 2013. **2**(3): p. 303.
113. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends in neurosciences, 1999. **22**(9): p. 391-397.
114. Wu, T.-C. and J.C. Grotta, *Hypothermia for acute ischaemic stroke*. The Lancet Neurology, 2013. **12**(3): p. 275-284.
115. Kilic, E., et al., *HMG-CoA reductase inhibition promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia*. Frontiers in cellular neuroscience, 2014. **8**: p. 422.
116. Kilic, U., et al., *Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice*. Redox Biol, 2017. **12**: p. 657-665.
117. Nakamura, K., et al., *The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(11): p. 4600-4610.
118. Bieber, M., et al., *Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion*. Stroke, 2019. **50**(10): p. 2875-2882.
119. Kuczynski, A.M., A.M. Demchuk, and M.A. Almekhlafi, *Therapeutic hypothermia: Applications in adults with acute ischemic stroke*. Brain circulation, 2019. **5**(2): p. 43.
120. Van Der Worp, H.B., et al., *Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis*. Brain, 2007. **130**(12): p. 3063-3074.
121. 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.
122. Li, S., et al., *Cold-inducible RNA binding protein inhibits H₂O₂-induced apoptosis in rat cortical neurons*. Brain research, 2012. **1441**: p. 47-52.

123. Zhuang, R.-J., et al., *Cold-inducible protein RBM3 protects UV irradiation-induced apoptosis in neuroblastoma cells by affecting p38 and JNK pathways and Bcl2 family proteins*. Journal of Molecular Neuroscience, 2017. **63**: p. 142-151.
124. Xu, L., et al., *Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2002. **22**(1): p. 21-28.
125. Daniele, S.G., et al., *Brain vulnerability and viability after ischaemia*. Nature Reviews Neuroscience, 2021. **22**(9): p. 553-572.
126. Yenari, M.A. and H.S. Han, *Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia*. Nature Reviews Neuroscience, 2012. **13**(4): p. 267-278.
127. Kawabori, M. and M. A Yenari, *Inflammatory responses in brain ischemia*. Current medicinal chemistry, 2015. **22**(10): p. 1258-1277.
128. Guo, Q.-H., C.-H. Liu, and J.-G. Wang, *Blood pressure goals in acute stroke*. American Journal of Hypertension, 2022. **35**(6): p. 483-499.
129. Anderson, C.S., et al., *Intensive blood pressure reduction with intravenous thrombolysis therapy for acute ischaemic stroke (ENCHANTED): an international, randomised, open-label, blinded-endpoint, phase 3 trial*. The Lancet, 2019. **393**(10174): p. 877-888.
130. Schöller, K., et al., *Characterization of microvascular basal lamina damage and blood–brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats*. Brain research, 2007. **1142**: p. 237-246.
131. Li, Y., et al., *New progress in the approaches for blood–brain barrier protection in acute ischemic stroke*. Brain research bulletin, 2019. **144**: p. 46-57.

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	11		Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

"Hipotalamik Termoregülasyonun İskemik Hasar Üzerindeki Nöroprotektif Etkisi" 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 AYŞIT	
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	