

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



İSKEMİK VE UZAK İSKEMİK
ARDKOŞULLANMANIN SEREBRAL
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA
APOPTOZ, NEKROPTOZ, PİROPTOZ VE
FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SÜMEYYE KESKİN

2025

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSKEMİK VE UZAK İSKEMİK ARDKOŞULLANMANIN
SEREBRAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
APOPTOZ, NEKROPTOZ, PİROPTOZ VE FERROPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Tez Yazarı

SÜMEYYE KESKİN

Danışman

PROF. DR. ENGİN ŞAHNA

HAZİRAN, 2025

ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY SAYFASI

Tez Başlığı: İskemik ve Uzak İskemik Ardkoşullanmanın Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarında Apoptoz, Nekroptoz, Piroptoz ve Ferroptoz Üzerine Etkileri

Tez Yazarı: Sümeyye KESKİN

Program/ Anabilim Dalı: Tezli Yüksek Lisans Programı/ Tıbbi Farmakoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tez İlk Teslim Tarihi: 02/06/2025

Tez Savunma Tarihi: 17/06/2025

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Üye Dr. Öğr. Üyesi Merve YILMAZ

BOZOĞLAN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Lokman Hekim

TANRIVERDİ

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

Prof. Dr. Mustafa İSSİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Sümeyye KESKİN

17/06/2025

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususunda bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, ideallerim doğrultusunda ilerlememe katkıda bulunan ve beni destekleyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Engin Şahna'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmaları boyunca laboratuvardaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Kevser Tanbek'e, biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesine katkı sağlayan Prof. Dr. Kazım Şahin ve ekibine süreçte bilgisini ve tecrübesini paylaştan Ecz. Gülnur Aslan'a ve Araş. Gör. Dr. Cansu Koç'a teşekkür ederim.

Lisans döneminde başladığım bilimsel çalışmalarım süresince birçok fedakârlık gösterip her daim yanımda olan ve beni destekleyen babam Cevdet Keskin'e, annem Serpil Keskin'e ve kardeşlerim Sena ve Emre'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim. Tez çalışmamı 30971 no.lu proje ile destekleyerek çalışmanın gerçekleşmesine olanak tanıyan Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB)'e, TF. 24.12 no.lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri destekleme birimi (FÜBAP)'a ve 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ile 122S040 numaralı projede bursiyer olma imkânı tanıdığı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	xvi
2. ABSTRACT.....	xviii
3. GİRİŞ	1
3.1. İnme	1
3.2. Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarı	3
3.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojik Mekanizması	4
3.3.1. İskemik Dönem.....	4
3.3.2. Reperfüzyon Dönemi	5
3.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Tedavisi.....	6
3.5. Koşullanma	7
3.5.1. İskemik Ardkoşullanma (PostC).....	9
3.5.2. İskemik Ardkoşullanmanın Moleküler Mekanizmaları	10
3.5.2.1. Mitokondri Bazlı Mekanizmalar.....	11
3.5.2.2. Otofajiye Dayalı Mekanizmalar.....	12
3.5.2.3. Antioksidan Mekanizmalar.....	12
3.5.2.4. Anti-inflamatuar Mekanizma.....	13
3.5.2.5. Anti-apoptoz Bazlı Mekanizma	14
3.5.3. Uzak İskemik Ardkoşullanma (RePostC).....	15
3.6. Hücre Ölümü.....	18
3.6.1. Apoptoz.....	20
3.6.1.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak.....	20
3.6.1.2. İnstrinsik Yolak.....	21
3.6.1.3. Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1	22
3.6.2. Nekroptoz.....	23
3.6.2.1. RIPK3	24

3.6.3. Piroptoz.....	25
3.6.3.1. Gasdermin D.....	27
3.6.4. PANoptoz.....	28
3.6.4.1. Z-DNA Bağlayıcı Protein 1.....	30
3.6.4.2. Dönüşüm Büyüme Faktörü-beta Aktive Kinaz 1.....	30
3.6.5. Ferroptoz.....	31
3.6.5.1. Uzun Zincirli Açıl-Koenzim A (CoA) Sentaz 4.....	33
3.7. Sestrin2.....	34
3.8. Mitokondrial Heksokinaz II.....	35
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
4.1. Deney Hayvanları.....	38
4.2. Deney Grupları.....	38
4.3. Cerrahi Uygulamalar.....	40
4.4. Nörolojik Defisit Skorlaması.....	45
4.5. Davranış Testleri.....	46
4.5.1. Açık Alan Testi (Open Field).....	47
4.5.2. Dikey Çubuk Testi (Vertical Pole test).....	47
4.5.3. Kiriş Yürüme Testi (Beam Walking Test).....	47
4.6. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması.....	48
4.7. 2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorid (TTC) Boyama.....	49
4.8. Western Blot Analizi.....	50
4.9. ELISA.....	51
4.10. İstatistik.....	52
5. BULGULAR.....	53
5.1. Nörolojik Bulgu Skorlaması.....	53
5.2. Davranış Testleri.....	54
5.2.1. Açık Alan Testi.....	54
5.2.2. Dikey Çubuk Testi.....	55
5.2.3. Kiriş yürüme testi.....	57
5.3. Nekroz Alanı Ölçüm Bulguları.....	58
5.4. Western Blot Bulguları.....	59
5.4.1. Apaf-1 protein ekspresyon düzeyleri.....	59
5.4.2. RIPK3 protein ekspresyon düzeyleri.....	61
5.4.3. Gasdermin D protein ekspresyon düzeyleri.....	62

5.4.4. ACSL4 protein ekspresyon düzeyleri	64
5.4.5. Sestrin 2 protein ekspresyon düzeyleri	65
5.4.6. Heksokinaz II protein ekspresyon düzeyleri.....	67
5.5. ELISA Bulguları	68
5.5.1. ZBP-1 düzeyleri	68
5.5.1. TAK-1 düzeyleri	69
6. TARTIŞMA	70
6.1. Öneriler	82
7. KAYNAKLAR	83
8. ÖZGEÇMİŞ	96



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Serebral I/R hasarında hızlı PostC ve gecikmeli PostC'nin nöroprotektif etkisinde rol oynayan ana mekanizmalar	18
Tablo 2. Bederson skorumu metodu	46
Tablo 3. Grupların hesaplanan nörolojik defisit skorları.....	53
Tablo 4. Gruplara göre açık alan testinde geçilen çizgi sayısı	55
Tablo 5. Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi.	56
Tablo 6. Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi.....	57
Tablo 7. Grupların hesaplanan nekroz alanları.	58
Tablo 8. Grupların Apaf-1 düzeyi üzerine etkileri.....	60
Tablo 9. Grupların RIPK3 düzeyi üzerine etkileri.....	61
Tablo 10. Grupların Gasdermin D düzeyi üzerine etkileri.....	63
Tablo 11. Grupların ACSL4 düzeyi üzerine etkileri.....	64
Tablo 12. Grupların Sestrin 2 düzeyi üzerine etkileri.....	66
Tablo 13. Grupların Heksokinaz II düzeyi üzerine etkileri.....	67
Tablo 14. Grupların ZBP-1 düzeyi üzerine etkileri.	68
Tablo 15. Grupların TAK-1 düzeyi üzerine etkileri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Beyin İskemisi.....	3
Şekil 2.	İskemi reperfüzyon hasarının şematik gösterimi	6
Şekil 3.	Koşullanma şekillerinin şematik gösterimi	8
Şekil 4.	RePostC'nin koruyucu etkilerine aracılık eden olası mekanizmalar	16
Şekil 5.	Apoptoz yolağının şematik gösterimi	22
Şekil 6.	Nekroptoz yolağının şematik gösterimi	24
Şekil 7.	Piroptoz Yolağının Şematik Gösterimi	27
Şekil 8.	PANoptoz Yolağının Şematik Gösterimi.....	30
Şekil 9.	Ferroptozun moleküler mekanizması.....	34
Şekil 10.	Çalışma amacının şematik gösterimi.....	37
Şekil 11.	Deney grupları.....	40
Şekil 12.	Middle serebral arterin tıkanmasının şematik görüntüsü.....	41
Şekil 13.	Kamon Karotid arterin belirlenerek nervus vagustan izole edilmesi	42
Şekil 14.	Deneysel fokal serebral iskemi modelinin oluşturulma aşamaları.....	43
Şekil 15.	PostC (A) ve RePostC (B) uygulamaları.....	44
Şekil 16.	İskemi ve reperfüzyon aşamalarında takibi yapılan sıçanlar	45
Şekil 17.	Sıçanlarda kullanılan nörolojik defisit skoru	46
Şekil 18.	Çıkarılan sıçan beyin dokusu	49
Şekil 19.	İnfarkt alanının hesaplanması.....	50
Şekil 20.	Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi.	54
Şekil 21.	Gruplara göre açık alan testinde geçilen çizgi sayısı	55
Şekil 22.	Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi.	56
Şekil 23.	Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi.	57

Şekil 24. Nekroz alanın (%C) gruplara göre değişimi Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi.	59
Şekil 25. Grupların Apaf-1 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.	60
Şekil 26. Grupların RIPK3 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.	62
Şekil 27. Grupların Gasdermin D düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.	63
Şekil 28. Grupların ACSL4 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri. ...	65
Şekil 29. Grupların Sestrin2 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri. ..	66
Şekil 30. Grupların Heksokinaz II düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.	67
Şekil 31. Grupların ZBP-1 düzeyi üzerine etkisi.....	68
Şekil 32. Grupların TAK-1 düzeyi üzerine etkisi.....	69

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Araşidonik asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACSL4	: Uzun zincirli yağ asil CoA sentaz
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AIM2	: İnterferon indüklenebilir protein
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
AMPK	: AMP-bağımlı protein kinaz
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ARE	: Antioksidan tepki elemanı
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: Bcl-2-ilişkili X proteini
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
bCCAO	: İki taraflı ortak karotid arter oklüzyonu
Ca²⁺	: Kalsiyum
CARD	: İşe alım alanı
CCA	: Kamon karotid arter
COX	: Siklooksijenaz
DAB	: Diaminobenzidin
DAMP	: Hasarla İlişkili Moleküler Kalıp
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EKA	: Eksternal Karotid Arter
ER	: Endoplazmik retikulum

FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
Fe²⁺	: Demir
FSP-1	: Ferroptoz baskılayıcı protein-1
GPX4	: Glutasyon peroksidaz 4
Gsdm D	: Gasdermin D
GSH	: Glutasyon
H⁺	: Hidrojen
HIF	: Hipoksiye duyarlı transkripsiyon faktörü
HK-II	: Heksokinaz II
HO-1	: Hem-oksijenaz-1
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
I/R	: İskemi Reperfüzyon
IL	: İnterlökin
İKA	: İnternal karotid arter
IKK	: İkB kinaz
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
L-OH	: Lipid alkollere
L-OOH	: Fosfolipid peroksidleri
L	: Litre
LOX	: Lipoksijenaz
LPCAT3	: Lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
mRNA	: Mesajcı RNA

miRNA	: mikroRNA
mK⁺ATP	: Mitokondriyal ATP'ye duyarlı potasyum kanalı
MLKL	: Karışık Soy Kinaz Alanı Benzeri Psödokinaz
mPTP	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği
mTORC1	: Rapamisin Komleks 1
Na⁺	: Sodyum
NDS	: Nörolojik Defisit Skor
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NHE	: Na ⁺ /H ⁺ kanalı
NLRC4	: NLR ailesi CARD alanı içeren protein 4
NLRP3	: NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren 3
NMDA	: N-metil-D-aspartat
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOX	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
OGD	: Oksijen Glikoz Yoksunluğu
OSA	: Orta serebral arter
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler kalıp
PBS	: Poli(bütülen süksinat)
PE	: Fosfatidiletanolaminin
PostC	: İskemik Ardkoşullanma
PreC	: İskemik Önkoşullanma
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
RePostC	: Uzak İskemik Ardkoşullanma

RIPK3	: Reseptörle etkileşime giren serin/treonin-protein kinaz 3
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
SS	S: standart sapma
TLR	: Toll- benzeri reseptörler
TMB	: Tümör mutasyon yükü
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
TTC	: 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VDAC-1	: Voltaj bağımlı anyon kanalı 1
ZBP-1	: Z-DNA bağlayıcı protein 1
μL	: Mikrolitre

1. ÖZET

İSKEMİK VE UZAK İSKEMİK ARDKOŞULLANMANIN SEREBRAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA APOPTOZ, NEKROPTOZ, PİROPTOZ VE FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Beynin bir bölgesinde kan dolaşımının kaybı ile karakterize edilen iskemik inme, dünya çapında mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir. Mekanik trombektomi veya intravenöz tromboliz gibi akut tedavi stratejilerindeki ilerlemelere rağmen, etkili tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu durum araştırmacıları yeni terapötik hedef keşfetmeye yönlendirir. İskemik ardkoşullanma (PostC), uzun süreli iskemiye takiben reperfüzyon başlangıcında uygulanan bir dizi kısa iskemi/reperfüzyon aralıkları olarak tanımlanır. Uzak iskemik ardkoşullanma (RePostC), iskemiden etkilenen hayati organları, vücudun uzak bölgelerine uygulanan girişimlerle korumayı amaçlayan, non-invaziv bir yaklaşımdır. Hasar sürecinde hücrel homeostaz önemlidir ve sağkalım/ölüm yanlısı süreçler eş zamanlı olarak aktive edilir. Apoptoz, kaspaz bağımlı düzenlenmiş bir hücre ölümüdür. Nekroptoz, nekrotik görünümlü düzenlenmiş bir hücre ölüm türü olarak tanımlanır. Piroptoz, enfeksiyon ve stresle ilişki sinyallere karşı fizyolojik sistemlerin savunmasında kritik öneme sahiptir. Ferroptoz ise demir bağımlı lipid peroksidasyonu ile karakterize hücre ölüm türüdür. Çalışmamızda serebral iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında hücre ölüm yollarından apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptozun rolü, mekanik bir tedavi olarak PostC ile RePostC'nin koruyuculukları ve PostC ile RePostC'nin Sestrin2 ve Heksokinaz II düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda Sprague Dawley ırkı, 10-12 haftalık 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. PostC orta serebral arter oklüzyonu sonrası reperfüzyon başlangıcında, 3 siklus 30 sn reperfüzyon/10 sn iskemi şeklinde, RePostC sağ arka bacağına 5'er dk 3 siklus reperfüzyon-iskemi şeklinde

uygulandı. Protein ekspresyon düzeyleri Western Blot ve ELISA ile tespit edildi; nekroz alanı için 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) boyaması ve lökomotor aktiviteyi değerlendirmek için açık alan, dikey çubuk ve kiriş yürüme testleri gerçekleştirildi.

Serebral I/R'a bağlı nekroz alan PostC ve RePostC uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. Uygulanan tedavi yöntemleri, davranış testlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadı. Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), Reseptörle etkileşime giren serin/treonin-protein kinaz 3 (RIPK3), Gasdermin D (GsdmD) ve Sestrin2 (Sesn2) düzeyleri I/R ile anlamlı olarak artarken PostC ve RePostC ile anlamlı olarak azaldı. Uzun zincirli yağ açıl-koenzim A sentaz 4 (ACSL4), I/R ile anlamlı olarak artarken RePostC uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. PostC uygulaması ile görülen azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Heksokinaz II (HK-II) düzeyleri I/R ile anlamlı olarak azalırken PostC ve RePostC ile tedavi edilen gruplarda anlamlı olarak arttı.

Serebral I/R hasarının patofizyolojik mekanizmasında apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz rol alabilir ve inflamasyon bu mekanizmaya eşlik edebilir. Serebral I/R hasarında PostC ve RePostC apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptozu inhibe ederek antiinflamatuvar mekanizmaların aktive olmasına yardımcı olarak koruyucu etki gösterebilir. Apaf-1, RIPK3, GsdmD, ACSL4 ile HK-II ve Sesn2 düzeyleri, serebral I/R hasarının tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilebilir. PostC ve RePostC uygulaması ile endojen tolerans mekanizmalarını tetiklemek serebral I/R hasarına karşı koruma sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: İskemik İnme, İskemik Ardkoşullanma, Piroptoz, Ferroptoz

2. ABSTRACT

EFFECTS OF ISCHEMIC AND REMOTE ISCHEMIC POSTCONDITIONING ON APOPTOSIS, NECROPTOSIS, PYROPTOSIS AND FERROPTOSIS IN CEREBRAL ISCHEMIC REPERFUSION INJURY

Ischemic stroke, characterized by the loss of blood circulation in an area of the brain, leads to a range of neurological deficits and is one of the leading causes of death and disability worldwide. Despite advances in acute treatment strategies such as mechanical thrombectomy or intravenous thrombolysis, effective treatment options are limited. This leads researchers to discover new therapeutic targets. Ischemic postconditioning (PostC) is defined as a series of short ischemia-reperfusion intervals applied at the onset of reperfusion following prolonged ischemia. Remote ischemic postconditioning (RePostC) is a noninvasive approach that aims to protect vital organs affected by ischemia by interventions applied to remote areas of the body. Cellular homeostasis is important during the injury process and pro-survival/pro-death processes are activated simultaneously. Apoptosis is a caspase-dependent regulated process. Necroptosis is defined as a regulated type of cell death with a necrotic appearance. Pyroptosis is critical in the defense of physiological systems against infection and stress-related signals. Ferroptosis is a mode of cell death characterised by iron-induced lipid peroxidation. In our study, we investigated the role of apoptosis, necroptosis, pyroptosis and ferroptosis among cell death pathways in cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury, the protective effects of PostC and RePostC as a mechanical treatment and the effects of PostC and RePostC on Sestrin2 levels.

This study was performed in 40 male Sprague Dawley rats aged 10-12 weeks. The rats were divided into 4 groups. At the beginning of reperfusion after middle cerebral artery occlusion, 3 cycles of 30 s reperfusion/10 s ischemia were performed as PostC; and

3 cycles of reperfusion-ischemia as RePostC were applied to the right hind leg for 5 min each. Protein expression levels were determined by Western blot; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining for necrosis area and open field, vertical bar and beam walking tests were performed to evaluate locomotor activity.

Cerebral I/R-induced necrosis area was significantly decreased with PostC and RePostC administration. The treatment methods applied did not cause a statistically significant difference in behavioural tests. Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3), Gasdermin D (GsdmD) and Sestrin2 (Sesn2) levels were significantly increased by IR and significantly decreased by PostC and RePostC. Long-chain fatty acyl CoA synthase 4 (ACSL4) was significantly increased by I/R and significantly decreased by RePostC treatment. The decrease with PostC treatment was not statistically significant. Hexokinase II (HK-II) level was significantly decreased by I/R, while it was significantly increased in PostC and RePostC treated groups.

Apoptosis, necroptosis, pyroptosis and ferroptosis may be involved in the pathophysiological mechanism of cerebral I/R injury and inflammation may accompany this mechanism. In cerebral I/R injury, PostC and RePostC may be protective by inhibiting apoptosis, necroptosis, pyroptosis and ferroptosis and triggering anti-inflammatory mechanisms. Apaf-1, RIPK3, GsdmD and ACSL4 and HK-II, Sesn2 levels may be a potential target for the treatment of cerebral IR injury. Inducing endogenous tolerance mechanisms by PostC and RePostC administration may protect against cerebral I/R injury.

Keywords: Ischemic Stroke, Ischemic Postconditioning, Pyroptosis, Ferroptosis

3. GİRİŞ

3.1. İnme

İnme, artan insidans ile dünya çapında önde gelen mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir (Jurcau ve Simion, 2022). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2019 yılında bildirdiği rapora göre her yıl 2.5 milyonun üzerinde insan inmeye bağlı olarak hayatını kaybetmektedir (DSÖ, 2019). Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK)'nun 2022 verilerine göre dolaşım sistemi hastalıkları en yaygın ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almakta olup bunun %19.2'sini serebrovasküler hastalıklar oluşturmaktadır (TUIK, 2022). İnme sonucu hayatta kalan hastalar sakatlık, uzun süre devam eden tedavi ve rehabilitasyon masrafları gibi problemler yaşamaya devam etmektedir. İnme bakımının yıllık maliyeti sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 52 milyar doların üzerinde olduğu bildirilmiştir ve maliyetlerin 2035 yılına kadar yaklaşık iki katına çıkması öngörülmektedir (Tsao ve ark., 2022).

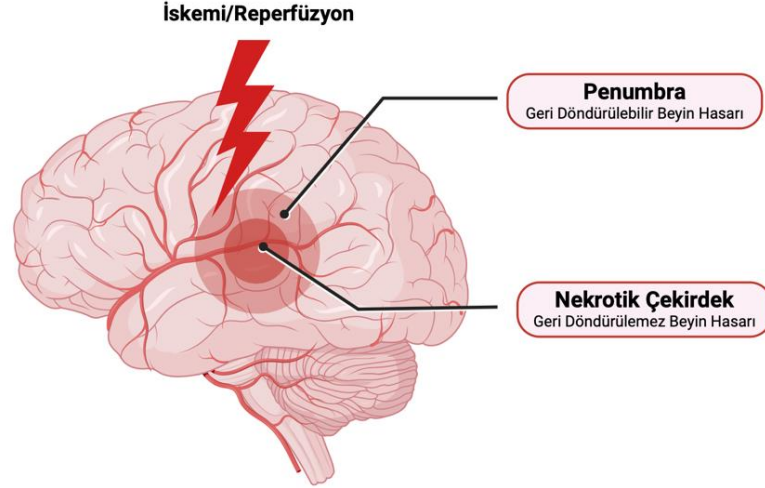
Serebral arterin tıkanması veya yırtılmasına bağlı olarak beyin dokusuna giden kan akışının kısmen veya tamamen kesilmesi inmeye neden olur. Bu durum uzun süreli beyin hasarına ve nörolojik bozulmaya yol açan akut bir serebrovasküler hasardır. (Eshak ve ark., 2017). Hasarın boyutu iskemiye maruz kalan alanın ne kadar büyük olduğuna, iskemik olayın ne kadar sürdüğüne, kan akışının ne kadar düşük olduğuna ve göreceli hipoksi ve hipoglisemi düzeyine göre farklılaşabilir (Fricker ve ark., 2018).

İnme meydana gelme nedenine ve patofizyolojik mekanizmasına bağlı olarak iskemik ve hemorajik inme olarak ikiye ayrılabilir. Hemorajik inme, beyne kan akışını sağlayan damarların doğrudan sıkışması veya yırtılması, iskemiye neden olacak şekilde kafa içi basıncının artması, kandan türetilen pıhtılaşma faktörlerinin, tamamlayıcı bileşenlerin, hemoglobin, hem ve demirin toksisitesi gibi çeşitli olaylar sonucunda

meydana gelebilir. Hemorajik inmede hücre ölümünün ana mekanizmalarının eksitotoksisite, kan toksisitesi, oksidatif stres ve inflamasyon olduğu düşünülmektedir (Aronowski ve Zhao, 2011; Wang, 2010).

İskemik inme beyne oksijen bakımından zengin kan sağlayan kan damarlarının çeşitli nedenlerle tıkanması sonucu meydana gelir; dünya genelinde tüm inmelerin yaklaşık %71'ini iskemik inme oluşturur. Bu tür inme, tromboz (lokal olarak oluşan bir kan pıhtısı nedeniyle), emboli (kandaki mobilize pıhtı nedeniyle) veya global iskemiden olduğu gibi (kan pıhtısı olmadığında sistemik hipotansiyon) farklı nedenlerle ortaya çıkabilir (Tuo ve ark., 2022).

İskemik inmeden hasar gören beyin dokusu kavramsal olarak çekirdek ve penumbra olarak ayrılmaktadır. Çekirdek, yüksek düzeyde iskemiye maruz kalan ve genellikle hızla nekrotik hale gelen merkezi alan olurken, penumbra daha düşük düzeyde iskemiye maruz kalan çekirdeğin çevresindeki alanlardır. Hücre ölümü penumbra alanında daha sonraki süreçte, çeşitli mekanizmalarla meydana gelmeye devam etmektedir ve genellikle daha önlenebilir olduğu düşünülmektedir. Penumbranın toplam lezyon hacminin yarısı kadarını oluşturduğunu ve dinamik değişikliklere uğradığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Fricker ve ark., 2018). İskemik hasar oluştuktan kısa bir süre sonra, penumbrada bulunan nöronlar, birkaç saat hatta günler boyu süren hayatta kalmayı destekleyen sinyal yollarını aktive etmektedir. Ancak zamanla enfarktüs çekirdeğinin yanında bulunan penumbradaki nöron yoğunluğu, glial hücrelerin aktivasyonu ile birlikte azalış gösterir. Sonuç olarak, enfarktüs lezyonları zamanla penumbranın zarar görmesine sebebiyet verecek şekilde genişleyebilir. Bu durum kalıcı hasar bırakarak, hayat kalitesini düşürerek sakatlığa ve hatta ölüme neden olmaktadır (Tuo ve ark., 2022).



Şekil 1. Beyin İskemisi (Fricker ve ark., 2018)

3.2. Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarı

Dokuda kan akışının geçici olarak azalması ya da tamamen kesilmesi iskemi olarak tanımlanır ve bu durum iskemik bölgeye oksijen ve besin iletimini engeller (Chen ve Vunjak-novakovic, 2018). Deneysel iskemi/reperfüzyon (I/R) modellerinde, reperfüzyon sonrası hasar boyutunun iskemi süresiyle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, hasar gören organa kan akışının mümkün olan en kısa sürede sağlanması büyük önem taşımaktadır. Ancak iskeminin neden olduğu beyin dokusundaki hasar, reperfüzyon olarak bilinen kan perfüzyonunun yeniden sağlanmasının ardından daha da ağırlaşmaktadır. Bu durum I/R hasarı olarak tanımlanmaktadır (Vishwakarma ve ark., 2017).

Daha önce iskemiye maruz kalan bir dokuda kan akışının yeniden sağlanması, oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (Jurcau ve Ardelean, 2021). Bu durum doğrudan veya dolaylı olarak apoptoza, kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmasına, serebral ödeme ve hemorajik transformasyona neden olacak bir dizi patolojik kaskadı tetikleyen proinflamatuvar sitokinlerin salınımının artmasına yol açmaktadır (Lin ve Wang, 2016).

3.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojik Mekanizması

Serebral I/R hasarı lokal ve sistemik etkileri olan karmaşık patofizyolojik mekanizmaları içermektedir. I/R hasarının meydana geldiği mekanizma net bir şekilde aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte mevcut çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, inflamasyonun bu sürece dahil olabileceğini ve sonuçta apoptoz, nekroptoz ve piroptozda olduğu gibi çeşitli mekanizmalarla hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2022). Bu süreç temel olarak iki aşamadan meydana gelir; ilk aşama iskemi sırasında kritik rol oynayan hücre enerjisi tükenmesi ve ikinci aşama reperfüzyon sırasında, inflamasyon ve apoptoz ile birlikte oksidatif ve mikrosirkülasyon stresinin etkileşimidir (Hentia ve ark., 2018).

3.3.1. İskemik Dönem

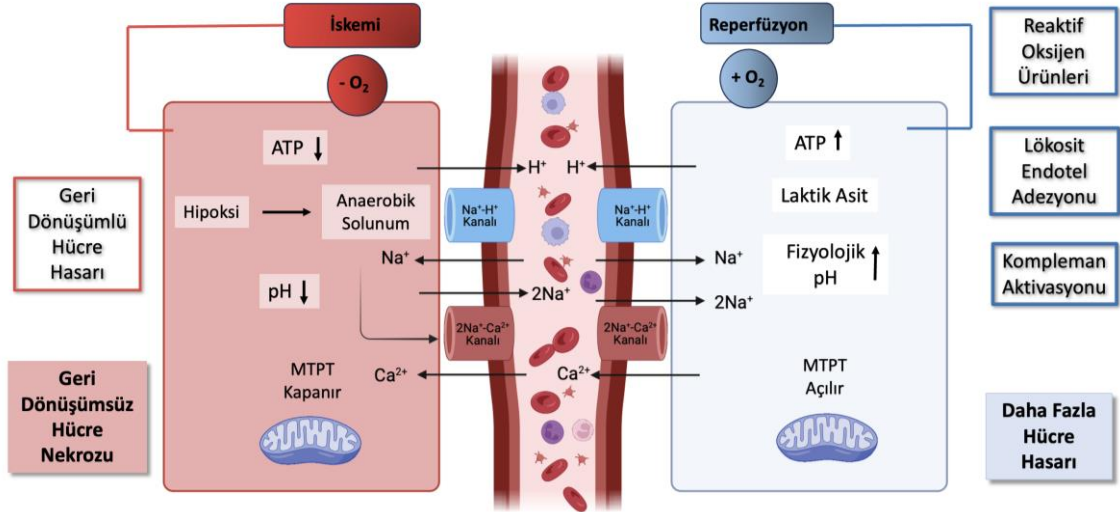
Kan akışı azaldığında veya tamamen kesildiğinde hücre anaerobik metabolizmaya yönelir. Bu durum hücre pH' şının düşmesine ve Adenozin trifosfat (ATP) üretiminin azalmasına neden olur. Mitokondrilerde gelişen iskemik koşullar hem anaerobik metabolizmayı hem de elektron taşıma zincirinin işlev bozukluğunu tetikleyerek ATP üretiminin daha fazla azalmasına neden olur. ATP üretimindeki azalma, Na⁺/K⁺-ATPaz pompasının etkinliğini kaybetmesine yol açar. Bu durum da intraselüler Ca²⁺, H⁺ ve Na⁺ iyonlarının artmasına, hücrelerin şişmesine ve sitoplazmik enzim aktivitesinin bozulmasına neden olur. Sonuç olarak, Na⁺/H⁺ kanalı, sodyum iyonları karşılığında biriken hidrojen iyonlarını ekstrüde eder. Oksijenin dokulara ulaşamaması, hücreleri anaerobik yolla ATP üretmeye zorlar; ancak bu üretim miktarı, ATP'ye bağımlı enzimlerin işlevini sürdürebilmesi için yetersiz kalır. Bu durum, özellikle endoplazmik retikulum ve hücre zarındaki Ca²⁺ taşıyıcılarının etkinliğini azaltır ve aktif kalsiyum geri

alımını engeller. Sonuç olarak, hücre içi kalsiyum iyonu derişimi artar. Bu birikim, hücre zararına zarar vererek apoptoz gibi hücre ölüm süreçlerini başlatır ve mitokondri fonksiyonunu bozar (Possomato ve ark., 2017). İskemik hasarda yer alan bir diğer önemli mekanizma ise, oksijene bağımlı çalışan protil hidrosilaz enzimlerinin hipoksi nedeniyle inhibe olmasıdır. Bu enzimlerin işlev kaybı, hipoksiyle ilişkili ve inflamatuvar sinyal yollarının translasyon sonrası süreçlerini aktive eder. Bu durum, nükleer faktör-κB (NF-κB) ile hipoksiye duyarlı transkripsiyon faktörlerinin (HIF) stabilitesini düzenleyerek gen ekspresyonunda transkripsiyon düzeyinde değişikliklere neden olur (Naito ve ark., 2020).

3.3.2. Reperfüzyon Dönemi

Kan akışının ani şekilde yeniden başlaması, iskemik süreç boyunca hücre dışında biriken hidrojen iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlar ve aerobik ATP üretimi için gerekli olan oksijen ile metabolik substratların tekrar hücreye ulaşmasına olanak tanır. Ancak, yapılan çalışmalarda uzun süreli iskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyonun da tehlikeli olabileceği gösterilmiş, hatta birçok dokuda nekroz gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir. Sonuç olarak reperfüzyonun tamamen masum olmadığı, önceki iskemik dönemde dokuya ulaşamayan kan akışının yeniden sağlanmasıyla ilişkili patolojik olaylarla hasara neden olduğu “reperfüzyon hasarı” kavramı ortaya çıkmıştır (Zhang ve ark., 2016). Reperfüzyon süreci, mitokondriyal disfonksiyon ve elektrolit dengesizliklerine ek olarak, ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX), siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve katekolaminlerin oksidasyonu gibi çeşitli biyokimyasal yollarla kısa sürede yoğun miktarda reaktif oksijen türü (ROS) üretimine neden olur. Peroksinitrit, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi çeşitli reaktif oksijen türleri, eşlenmemiş bir elektrona sahip moleküller veya fragmanlardır.

Reaktif oksijen türlerinin tutulması, hücre ve organel zarlarının tahrip olmasına ve sonuçta enzim inaktivasyonu ile deoksiriboz nükleik asit (DNA)'ın tek iplikli kırılmasının yanı sıra nükleer enzim poli (ADP-riboz) sentetazın aktivasyonunu indükleyerek nekroz, apoptoz, otofaji, mitoptoz ve nekroptoz yoluyla hücre ölümüne yol açar. Çoklu doymamış yağ asidi oksidasyonuna yol açan bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu, daha sonra biyolojik membran yapısını bozar ve malondialdehit gibi toksik metabolitler üretir. Geri dönüşü olmayan hücresel hasarı önlemek için iskemik organa kan akışının restorasyonu önemli olmasına rağmen, reperfüzyon iskemiden oluşturulan doku hasarını daha da artırmaktadır (Anzell ve ark., 2018; Halladin, 2015).



Şekil 2. İskemi reperfüzyon hasarının şematik gösterimi (Hausenloy ve Yellon, 2013)

3.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Tedavisi

I/R hasarında kullanılacak tedavilerin etkin olabilmesi için semptomların başlamasıyla birlikte mümkün olan en kısa sürede uygulanması oldukça önemlidir. Nöronal hasardan önce iskemik bölgeye kan akışını ve oksijeni geri getirmeyi amaçlayan reperfüzyon tedavileri uygulanır. İntravenöz tromboliz ve mekanik trombektomi, iskemiden sonrası serebral kan akışını geri kazandırmak için yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleridir. İntravenöz doku plazminojen aktivatörü (IV tPA), akut inme tedavisi için

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay alan tek trombolitik ajandır. Yapılan çalışmalarda iskemiden sonra 3 saat içinde verildiğinde hastalarda iyileşme gözlemlenmiştir. 2017 yılında yapılan bir başka çalışma, 6 saat içinde intravenöz tPA tedavisinin hastalar üzerinde hala etkili olduğunu göstermiştir. Ancak terapötik zaman aralığı nispeten kısa (~ 4,5-6 saat) olduğundan, tPA tedavisinin inme hastalarında kullanımı kısıtlıdır (Datta ve ark., 2020; Powers, 2020).

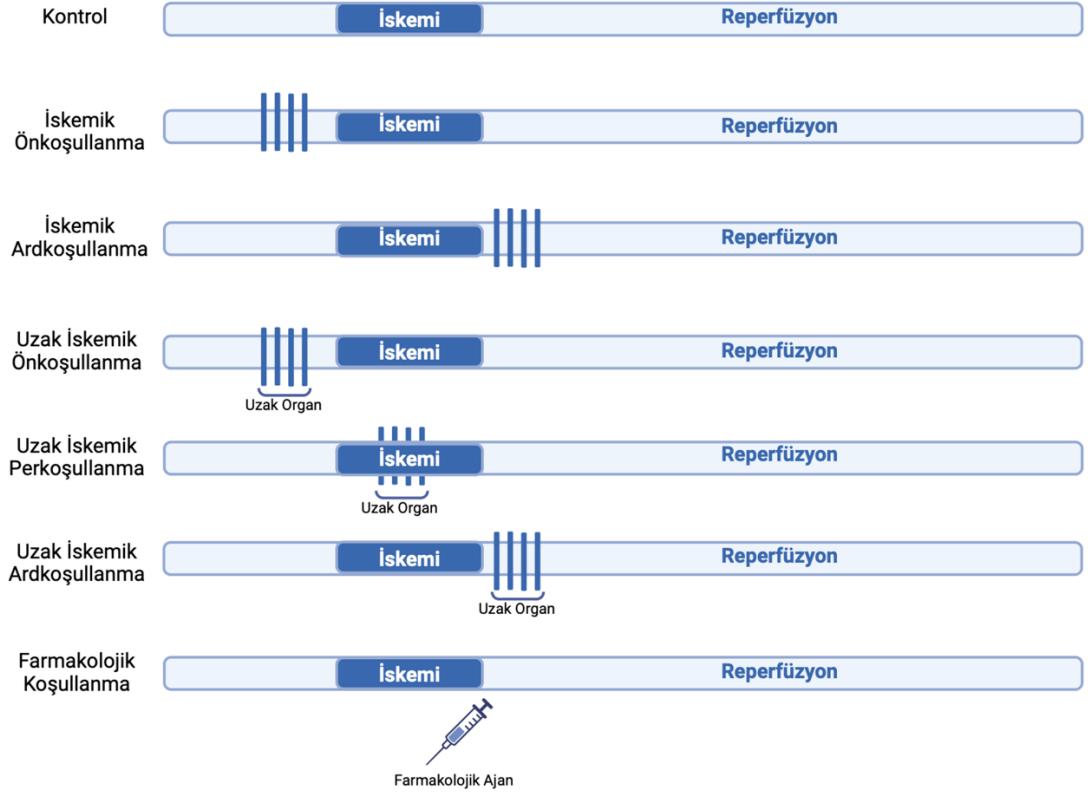
Arterlerden trombozu çıkarmak için cerrahi bir prosedür olan mekanik trombektomi, yaygın olarak kullanılan bir başka reperfüzyon tedavisidir. Trombektomi, inme sonrası sakatlığı azaltmada etkilidir, ancak etkinliği ve güvenliği inme başlangıcından sonraki 8 saat içinde sağlanabilmektedir (Shen ve ark., 2021).

Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda, inme sırasında kullanılan nöroprotektif ajanların etkisinin beklenen düzeyde olmadığı, terapötik aralığı aşan dozda verildiğinde beyin dokusuna daha fazla hasar verebilecek beyin kanaması riskini arttırdığı bildirilmiştir. Nöroproteksiyon için beynin kendi endojen koruyucu stratejilerini ortaya çıkarmanın önemli olduğu düşünülmektedir (Fan ark., 2017). Bu nedenle, yeni endojen nöroprotektif stratejilerin, yani iskemik ardkoşullanma ve uzak iskemik ardkoşullanma gibi yeni terapötik yaklaşımların araştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur (Burda ve ark., 2006).

3.5. Koşullanma

Koşullanma, uzun süreli iskemi maruziyetini takiben bir dizi kısa iskemi (hipoksi) ve reperfüzyon (reoksijenasyon) aralıklarının uygulanması olarak tanımlanır. Kalp ve beyin gibi iskemiye karşı yüksek duyarlılığa sahip organlarda iskemik koşullanmalar potansiyel terapötik uygulamalar olarak kabul edilmektedir (Vinten ve Shi, 2011).

İskemik koşullanmalar iskemi öncesinde, sırasında ve reperfüzyon sonrasında hücre ölümünü azaltmaya yönelik beynin kendi endojen koruyuculuğunu uyararak yaklaşımlardır. İskemiden önce uygulanırsa iskemik önkoşullanma (PreC), reperfüzyonun başlangıcı esnasında uygulanırsa iskemik ardkoşullanma (PostC) olarak tanımlanır. Bunların yanı sıra koruyucu uyarı şiddetli I/R hasarının oluşturduğu dokudan uzaktaki bir bölgede (RePostC) bulunan doku veya organda oluşturularak da tedavi yöntemi olarak kullanılabilir (Hausenloy ve Yellon, 2011). Non-invaziv bir yöntem olduğu için koruyuculuğunun gösterilmesi ve aracı mekanizmaların ortaya konulması klinikte uygulanacak tedavilerin etkin kılınması için oldukça önemlidir.



Şekil 3. Koşullanma şekillerinin şematik gösterimi

3.5.1. İskemik Ardkoşullanma (PostC)

İskemik ardkoşullanma (PostC), beynin kendi endojen adaptif mekanizmalarını harekete geçirerek serebral I/R hasarına karşı nöroproteksiyon sağlayan reperfüzyon aşamasında kan akışının aralıklı kesintisi ve yeniden sağlanması olarak tanımlanır. PostC zaman profilinin farklılığına göre hızlı PostC ve gecikmiş PostC olmak üzere ikiye ayrılır. Hızlı PostC, reperfüzyondan birkaç saniye veya dakika sonra uygulanırken, gecikmiş PostC reperfüzyondan birkaç saat veya gün sonra uygulanmaktadır. PostC'nin nöroprotektif mekanizmaları tamamen aydınlatılmamış olsa da sinaptik sinyali düzenleme, oksidatif stres ve inflamasyonu azaltma, mitokondriyal bütünlüğü koruma, endoplazmik retikulum stresini inhibe etme, otofajiyi düzenleme, PI3K/Akt yolunu aktive etme, apoptozu inhibe etme ve nörovasküler üniteyi koruma gibi çeşitli mekanizmalarla etki gösterdiği tahmin edilmektedir (Fan ve ark., 2017).

Kalıcı distal orta serebral arter (OSA) oklüzyonu ile birlikte geçici iki taraflı ortak karotid arter oklüzyonu (bCCAO) oluşturulan fokal serebral iskemi sıçan modelinde, reperfüzyonun başlangıcında 30 saniyelik reperfüzyon 10 saniyelik iskemiden oluşan, üç döngü ile gerçekleştirilen hızlı iskemik PostC'nin, penumbradaki enfarktüs hacmini ve apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2006). Hızlı PostC'nin koruyucu etkileri, fokal veya global serebral iskemi dahil olmak üzere birçok serebral iskemi modelinde doğrulanmıştır. İskemik PostC'nin hasarlı beyni birçok açıdan koruduğu gösterilmiştir. Sadece nekroz alan, nöral ölüm, nörolojik fonksiyon eksiklikleri, beyin ödemi ve KBB bozulmasını azaltmak ve akut fazda serebral kan akışını stabilize etmekle kalmayıp, aynı zamanda iskemi sonrası iyileşme aşamasında nörojenezi ve anjiyogenezi de iyileştirmektedir (Esposito ve ark., 2015; Yu ve ark., 2015).

Hızlı iskemik PostC ile kıyasla gecikmiş iskemik PostC ile yapılan çalışmaların sayısı literatürde sayıca azdır. Buna rağmen bir çalışmada OSA ile birlikte uygulanan

geçici bCCAO modelinde, reperfüzyondan 3 saat veya 6 saat sonra uygulanan ipsilateral kamon karotid arterin (CCA) 15 dakikalık oklüzyon 15 dakikalık reperfüzyon (6 döngülü) ile gecikmiş PostC'nin, reperfüzyondan sonraki 2. günde enfarktüs boyutunu azalttığını ve aynı zamanda nörolojik hasarı anlamlı şekilde azalttığı kanıtlanmıştır. İskemiden 2 ay sonrasına kadar devam eden iyileşmeler gecikmiş iskemik PostC'nin uzun vadeli bir nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ren ve ark., 2008).

Araştırmacılar tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada hızlı iskemik PostC'nin gecikmiş PostC ile kombine edilmesinin, sıçanlarda geçici OSA oklüzyonu ve reperfüzyonun neden olduğu enfarktüs, her iki yaklaşımın tek başına uygulanmasına kıyasla daha da azalttığı ve hatta önlediği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2015).

Hem hızlı PostC hem de gecikmeli PostC'nin koruyucu olduğu doğrulandığından, erken ve gecikmiş iskemik PostC kombinasyonu, her iki iskemik PostC tipinden daha güçlü nöroproteksiyon sağlayabilir (Fan ve ark., 2017).

3.5.2. İskemik Ardkoşullanmanın Moleküler Mekanizmaları

Serebral iskemi, glutamat eksitotoksitesisi, mitokondri disfonksiyonu, serbest radikal reaksiyonları, inflamasyon ve çoklu sinyal iletim yolları dahil olmak üzere karmaşık bir dizi süreci tetikler. Beyindeki nöronal, glial hücreler ve vasküler bileşenler gibi hücre tipleri bu sürece dahil olur. Bu karmaşık süreçler nöronal nekroza, apoptoza, beyin enfarktüsüne ve nörolojik fonksiyonların bozulmasına yol açar. Tıpkı serebral iskemideki karmaşık hasar mekanizmaları gibi PostC'nin koruyucu mekanizmaları da değişken ve iç içe geçmiştir. PostC'nin nöroprotektif mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olsa da merkezi sinir sisteminde bir dizi molekül ve sinyal yolunun PostC'ye bağlandığı rapor edilmiştir (Fan ve ark., 2017). Sinaptik sinyalleme düzenlenmesi, oksidatif stres ve inflamasyonun zayıflaması, mitokondriyal bütünlüğün

korunması, endoplazmik retikulum stresinin inhibisyonu, fosfoinozid 3-kinaz/Akt yolunun aktivasyonu, apoptozun inhibisyonu ve nörovasküler ünitenin korunması dahil olmak üzere PostC' nin nöroprotektif mekanizmalarına katkıda bulunmak için birden fazla mekanizma üzerinde durulmuştur (Sun ve ark., 2018).

3.5.2.1. Mitokondri Bazlı Mekanizmalar

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu serebral I/R hasarının gerçekleşmesinde önemli bir rol oynar. Mitokondri iç zarında mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğinin (mPTP) açılması mitokondri hasarına neden olan kritik olaylardan biridir. Bu süreç, membran potansiyelinin azalmasına, solunum zincirinin ayrılmasına, ROS aşırı üretimine ve sonuçta nöronal apoptoz veya nekroza neden olabilecek sitokrom c gibi proapoptotik faktörlerin salınmasına yol açar (Wang ve ark., 2015). Daha önce yapılan çalışmalarda iskemik PostC'nin, aşırı mitokondriyal ROS üretimini, hacim olarak artışını ve membran potansiyeli azalmasını ortadan kaldırarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Mitokondriyal ATP'ye duyarlı potasyum (mK^+ATP) kanallarının, reperfüzyondan sonra erken veya gecikmiş fazda uygulanan kimyasal PostC, iskemik PostC ve RePostC dahil olmak üzere farklı PostC formlarından etkilendiği gösterilmiştir (Liang ve ark., 2013).

mK^+ATP kanalları mitokondrinin iç zarında bulunur ve bunların açılması mitokondriyal zar potansiyellerini depolarize edebilir, bu da mitokondriyal kalsiyum yükünü daha da azaltır ve mPTP açılmasını engeller. mK^+ATP blokeri 5-hidroksidekanoat, mPTP'nin PostC kaynaklı kapanmasının yanı sıra nörolojik korumayı da bloke edebilir. Bu nedenle mK^+ATP kanallarını açarak mPTP açılmasının engellenmesi PostC'nin koruyuculuğunda rol oynayan anahtar mekanizmalardan biridir (Sun ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015).

3.5.2.2. Otofajiye Dayalı Mekanizmalar

Otofaji, fizyolojik koşullarda hücre içi homeostazın korunmasına yardımcı olan, daha sonra yeniden kullanım için hücre içi makromoleküllerin veya organellerin korunması için hayati öneme sahip bir hücreysel yoldur. Otofaji serebral I/R ile aktive edilebilir, ancak rolü tartışmalı olmaya devam etmektedir. Yapılan son çalışmalarda, kalıcı ve geçici OSA oklüzyonu modellerinde otofajinin rolleri araştırılmıştır. İlginç bir şekilde, otofajinin engellenmesi kalıcı iskemiye maruz kalan beyinleri korurken, I/R'nin neden olduğu beyin hasarını ağırlaştırdığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Otofaji serebral I/R hasarının iskemi fazında ve sonraki reperfüzyon aşamasında farklı roller oynar ve sağkalım/ölüm arasında “iki ucu keskin kılıç” olarak görev alır. Kalıcı distal OSA oklüzyonu ile birlikte uygulanan geçici bCCAO modelinde, otofaji inhibisyonunun iskemik PostC uygulaması sonrası nöroproteksiyonu indükleyebileceğini bildirmiştir. Yapılan başka bir çalışmada uzak iskemik PostC'nin, mitokondriyal hasara katkıda bulunabilecek AKT/GSK3 β ve Bcl-2 yolu ile otofajiyi aktive ettiği raporlanmıştır. Bu çalışmalar arasındaki tutarsızlığın PostC'nin farklı iskemi yaralanma modellerine göre otofaji üzerinde muhtemel çift yönlü düzenleme etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Fan ve ark., 2017). Ancak, bu varsayımı doğrulamak için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

3.5.2.3. Antioksidan Mekanizmalar

Toksik serbest radikallerin aşırı birikmesi, çeşitli sinyal yolları ile oksidatif hasara yol açarak serebral iskemik hasarın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle antioksidasyon iskemik inme için potansiyel bir terapötik strateji kabul edilir. Hızlı veya gecikmeli PostC'nin, yetişkin sıçanlarda fokal serebral iskemi ve global beyin iskemisi dahil olmak üzere farklı serebral iskemi modellerinde süperoksit dismutaz,

glutasyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif stresi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2016).

Ana transkripsiyon faktörü olarak nükleer faktör eritroidle ilişkili faktör 2'nin (Nrf2), serebral iskemide bir dizi antioksidan geni yukarı doğru düzenleyerek nöroproteksiyona aracılık ettiği düşünülmektedir. Nrf2, antioksidan tepki elemanına (ARE) bağlanır ve hem-oksijenaz-1 (HO-1) ve kinon oksidoredüktaz-1 (NQO-1) gibi faz II detoksifiye edici antioksidan enzimlerin ARE aracılı ekspresyonunu aktive eder. Benzer bir sonuç, RePostC modelinde de gösterilmiştir. Bir çalışmada uzak iskemik PostC'nin, HO¹, NQO-1 ve Nrf2'nin ifadesini yukarı doğru düzenlediği bildirilmiştir. Birlikte ele alındığında bu bulgular, Akt/Nrf2 yolunun PostC'nin neden olduğu antioksidatif etkide vazgeçilmez bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Fan ve ark., 2017).

3.5.2.4. Anti-inflamatuar Mekanizma

İnflamasyon akut iskemiye takiben sekonder hasara ve daha fazla doku kaybına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda hızlı PostC'nin nöral koruyucu etkileri için inflamatuvar mekanizmanın inhibisyonunun etkili olduğu gösterilmiştir. Joo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, iskemik PostC'nin iskemik beyindeki mikrogliya, makrofaj, CD4 ve CD8 T hücreleri ve B lenfosit sayısındaki artışları önemli ölçüde ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada da PostC'nin iskemik beyinde pro-inflamatuar faktörleri IL-1 β , IL-6, TNF- α , ICAM-1 ve iNOS'u aşağı, antiinflamatuvar faktör TGF- β 1'i yukarı regüle ettiğini raporlamıştır (Wang ve ark., 2016).

Toll- benzeri reseptörler (TLR), endojen veya eksojen inflamasyonda görev alan ana sinyal yollarından biri olarak bilinmektedir. Bazı çalışmalar, TLR2 ve TLR4'ün serebral I/R tarafından indüklenen nöroinflamasyona aracılık etmede kritik rol oynadığını göstermiştir. TLR2 veya TLR4-knockout farelerde, yabani farelere kıyasla serebral I/R

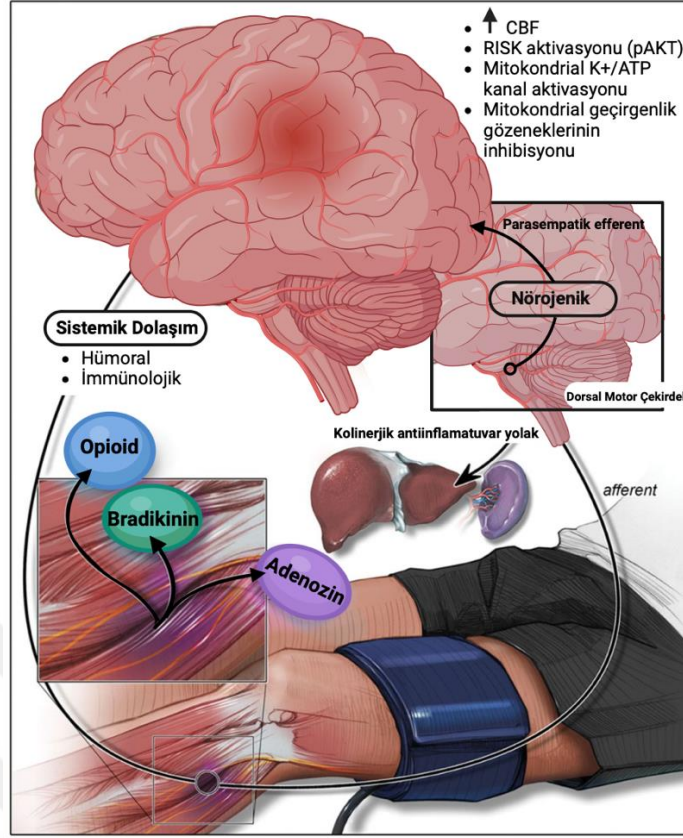
hasarının ağırlaştığı kanıtlanmıştır (Wang ve ark., 2016). İyi bilinen pro-inflamatuar transkripsiyon faktörlerinden NF-κB; IL-1β, IL-6, TNF-α, iNOS gibi proinflamatuar genlerin transkripsiyonunu açıklayan TLR'lerin önemli bir sinyal yoludur ve normalde sitoplazmada bulunur. NF-κB inhibitör proteini IκB, IRAK ailesi proteinleri tarafından fosforile edildiğinde, NF-κB ortamdan salınır, çekirdeğe geçer ve ardından birçok proinflamatuar genin transkripsiyonunu teşvik eder. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PostC'nin TLR2, TLR4 ekspresyonunu ve NF-κB aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Qi ve ark., 2016). Ayrıca araştırmacılar tarafından, iskemik PostC, TLR'lerden, IL-1 reseptörlerinden veya IL-18 reseptörlerinden gelen sinyalleri NF-κB'ye ileten IRAK4 ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmalar, IL-1β, IL-6, TNF-α, iNOS ve ICAM-1 ekspresyonunun PostC tarafından inhibisyonunun en azından kısmen TLR2, TLR4/IRAK4/NF-κB yolunu aşağı düzenleyerek olduğunu göstermektedir (Wei ve ark., 2015).

3.5.2.5. Anti-apoptoz Bazlı Mekanizma

Nöronlarda anti-apoptoz mekanizma, serebral I/R'u takiben penumbra hasarını engellemekte önemli işleve sahiptir. Çok sayıda çalışma PostC'nin anti-apoptoz etkisini desteklemektedir. Hem hızlı hem de gecikmeli PostC, bölünmüş Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-9 ve Bax gibi pro-apoptoz proteinlerini aşağı doğru düzenleyerek, anti-apoptoz protein olarak bilinen Bcl-2'yi yukarı doğru düzenleyerek nöronal apoptozu azaltabilir. Ek olarak PostC daha önce belirtildiği gibi oksidatif stresi, inflamasyonu ve mitokondriyal disfonksiyonu inhibe ederek, endoplazmik retikulum stresini azaltarak, sinaptik sinyalleme ve otofajiyi düzenleyerek, PI3K/Akt yolunu aktive ederek nöronal apoptozu dolaylı olarak inhibe edebilir (Cheng ve ark., 2014; Liang ve ark., 2014).

3.5.3. Uzak İskemik Ardkoşullanma (RePostC)

Klasik iskemik PostC güçlü bir nöroproteksiyon sağlasa da, invaziv bir yöntem olarak klinikte uygulamasının zorluğu nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle, geleneksel iskemik PostC konseptini uzak iskemik PostC'ye ve kimyasal PostC'ye genişletmek onu daha uygulanabilir hale getirir (Li ve ark., 2016). Beyin reperfüzyonunun başlamasından hemen sonra veya reperfüzyondan sadece birkaç dakika önce bir distal arter bölgesine uygulanan birkaç dakikalık I/R döngüleri tarafından indüklenen RePostC beyni hasardan korumak için ortaya çıkan bir kavramdır. Klinikte RePostC, standart bir kol veya bacak tansiyon aleti manşonunun tekrarlayan şişirme/söndürme işlemlerini gerçekleştirerek uygulanan ve vital organları I/R hasarından korumak için oldukça etkili bir tedavi oluşturan, son derece basit ve düşük maliyetli bir müdahaledir. Kolay erişilebilir ve non-invaziv bir yöntem olması, akut iskemik inme gibi iskemik temelli akut, subakut ve kronik nörolojik hastalıklar dahil çeşitli koşullarda tedavi potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Hess ve ark., 2015). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, RePostC tedavisinin akut iskemik inmeli hastalarda ani nöroprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Hougaard ve ark., 2014). RePostC' nin nöroprotektif etkisi hüморal, nöronal ve immünolojik yolak olmak üzere 3 farklı yolak ile sağlanmaktadır (Dezfulian ve ark., 2013).



Şekil 4. RePostC'nin koruyucu etkilerine aracılık eden olası mekanizmalar (Hess ve ark., 2013)

RePostC'nin hümorale yolla koruyuculuk sağladığına ilişkin iki temel mekanizma öne sürülmektedir. İlki, uzak bir organa uygulanan RePostC sonrasında, bu bölgede salınan koruyucu moleküllerin dolaşım sistemi aracılığıyla hedef organa taşındığı düşünülmektedir. İkincisi ise, RePostC uygulanan bir tavşandan alınan kanın başka bir işleme tabi tutulmamış tavşana aktarılması durumunda, alıcı hayvanda da iskemik hasara karşı benzer bir koruyucu etkinin gözlemlenmiş olmasıdır (Hahn ve ark., 2011). Bu koruyuculuğa aracılık eden ve iskemik inme çalışmaları ile doğrulanmış hümorale faktörlerin; eritropoietin, adenosin A1 reseptörü, HO-1 ve NOS olduğu bilinmektedir (Dezfulian ve ark., 2013).

Nöronal yolak aracılığıyla sağlanan koruyucu etkinin çeşitli deneysel çalışmalarla desteklendiği bilinmektedir. Örneğin, afferent nöron iletimini engelleyen kapsaisin uygulamasının, sıçanlarda RePostC'nin serebral iskemiye karşı sağladığı koruyuculuğu

ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Malhotra ve ark., 2011). Benzer şekilde, OSA oklüzyonu uygulanan sıçanlarda, RePostC'nin nöroprotektif etkisinin ganglion blokörü heksametyum ile baskılanabildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, vagal preganglionik nöronların nöronal sinyal iletiminde merkezi bir rol üstlendiği ve parasempatik efferent nöronların aktivasyonunun iskemiye karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Vagal sinir stimülasyonunun serebral nekroz alanını azaltması, bu sinirlerin RePostC aracılığıyla gerçekleşen koruyucu mekanizmadaki katkısını ortaya koymaktadır (Sun ve ark., 2012).

İmmünolojik yolak açısından değerlendirildiğinde, uzak organlarda iskemiye maruz bırakılan sağlıklı bireylerde, pro-inflamatuar gen ekspresyonunda azalma, anti-inflamatuar genlerde ise artış gözlenmiştir. Ayrıca nötrofil aktivitesinin baskılandığı bildirilmiştir. Sıçanlarda, RePostC uygulamasını takiben periferik kanda CD3⁺/CD8⁺ T hücreleri ile CD3⁺/CD161a⁺ doğal öldürücü T hücre oranlarında azalma, buna karşılık CD43⁺/CD172a⁺ non-inflamatuar monositler ve B lenfosit oranlarında artış tespit edilmiştir. Bu immünolojik yanıt değişikliklerinin nörolojik fonksiyonlardaki iyileşme ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2016).

Tablo 1.Serebral I/R hasarında hızlı PostC ve gecikmeli PostC'nin nöroprotektif etkisinde rol oynayan ana mekanizmalar (Fan ve ark., 2017).

Mekanizmalar	PostC		RePostC	
	Hızlı	Gecikmeli	Hızlı	Gecikmeli
Glutamat metanolizmasının düzenlenmesi	✓	✓	-	-
Anti-inflamasyon	✓	-	✓	-
Mitokondriyal hasarın inhibisyonu	✓	✓	✓	✓
Otofajinin düzenlenmesi	✓	-	✓	-
Anti-oksidasyon	✓	✓	✓	-
PI3K/Akt yolunun aktivasyonu	✓	✓	✓	-
Anti-apoptoz	✓	✓	✓	✓

3.6. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, fizyolojik olayları kontrol etmek, organ boyutunu ve işlevini korumak için gerekli olan düzenlenmiş homeostatik mekanizmadır. Hücre ölümünün fizyolojik mekanizmaları hücre sayısını kontrol etmek ve enfekte, mutasyona uğramış veya hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için savunma stratejisi olarak kullanılır (Fricker ve ark., 2018).

İskemik inme meydana geldiğinde, nöronal dokular hipoperfüze olarak oksijen ve glukozun ilgili bölgede tükenmesine neden olur. Bu durum, hücrenin hayatta kalması için gerekli olan enerjiye bağlı süreçlerin olumsuz etkilenmesine sebebiyet verir (Sekerdag ve ark., 2018). Çekirdek iskemik bölge içinde ATP, oksijen ve glikozun yoksunluğu şiddetli aynı zamanda geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle nekroza neden olur. Penumburada

ise bu tükenme hücrel fizyolojik işleyişi engeller, ancak geri dönüşü olmayan bir değişime neden olmaz. Penumbra içindeki hücreler apoptoz ve otofagositoza uğrar.

Zar lipitleri, proteinler ve nükleik asit molekülleri I/R hasarına karşı en duyarlı olan hücrel yapılarıdır. I/R sonucunda oluşan serbest radikaller hücre zarı hasarına, proteinlerin fragmentasyonuna ve modifikasyonuna neden olarak proteinlerde proteolitik degradasyona ve lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Lipid peroksidasyonun aldehit ürünleri de proteinlere ve DNA'ya kovalan biçimde bağlanarak onların işlevlerinde değişikliğe ve tüm bunların sonucunda da hücrelerin ölümüne neden olurlar (Bayram, 2014; Şenol ve Tunçtan, 2016). Ayrıca, hücrel enerji tükenmesini ve apoptozu şiddetlendiren mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Membran iyon pompasının fonksiyonu kaybetmesi ve KBB bozulması sitotoksik ödemle sonuçlanır. Bu zararlı etkileri telafi etmek için, uyarıcı nörotransmitterlerden glutamat ve aspartat aşırı salgılanır. Bunlar α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA), N-metil-D-aspartat (NMDA) ve kinat reseptörleri aracılığıyla etki eder ve eksitotoksisite ile sonuçlanan Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının akışını artırır. Eksitotoksisite, oksidatif ve nitrozatif stresle birlikte, hücrel hasarda yer alan sinyal yollarını açar (Datta ve ark., 2020).

Hücre ölümünün tipi iskeminin süresi, aerobik derece ve rezidüel kan akışı ile ilişkili olabilmektedir. Orta derecede serebral I/R hasarı hücrede otofaji gibi hayatta kalma sistemlerini aktive edebilirken, ciddi hasar esas olarak apoptotik ve nekrotik ölüm yollarını aktive etmektedir (Zhang ve ark., 2022). Şu anda iskemik inmede nöronal ölümde çoklu hücrel ölüm yollarının rol oynadığına inanılmaktadır; ancak, bu bağlamda bir veya daha fazla yolun özel bir öneme sahip olup olmadığı hala belirsizliğini korumaktadır.

3.6.1. Apoptoz

I/R, hücre hasarına ve ölümüne yol açan ROS aşırı atışı, endotelial mediyatörlerin salınımı, lökosit aktivasyonu gibi bir dizi süreci başlatan apoptotik olayları indükler. Apoptoz, dışsal ölüm reseptörü aracılı (ekstrinsik) veya mitokondri bağımlı (intrinsik) yolun aktivasyonundan kaynaklanır. Dışsal yolun aktif olması durumunda, plazma membranı, hücre içi ve hücre dışı ortam arasında "iletişim için anahtar panosu" olarak işlev görür ve plazma membranı üzerinde ifade edilen ölüm reseptörleri apoptotik olayları başlatır. İçsel mekanizmalar mitokondri ile ilgili olaylara bağlıdır ve mitokondride bulunan hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik üyeleri içeren Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir (Kalogeris ve ark., 2012).

Morfolojik olarak apoptozda hücre büzülür ve piknotik hale gelir. Bu süreci DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmanın hücre zarına baskı uygulaması takip eder. Plazma zarının yırtılmasını, çekirdeğin parçalanmasına neden olan koşullar izler. Ayrıca bu durum hücrelerin çevre dokularından ayrılmasına ve sıkıca paketlenmiş organellerle gömülü sitoplazma ile hücre fragmanlarına ayrılmasına neden olur. Daha sonra, apoptotik cisimler olarak adlandırılan bu kompakt cisimler tomurcuk benzeri yapılar oluşturur. Hücre zarından salınan fosfatidilserin, makrofaj ve parankima gibi bazı hücreleri, daha fazla bozunma için fagositize etmek ve sekonder nekrozu önlemek için artırır (Obeng, 2021).

3.6.1.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Ekstrinsik apoptozda, hücre dışı sinyaller plazma zarı üzerindeki ölüm reseptörleri tarafından tanınır ve ölümü indükler (Ketelut ve Fitzgerald, 2022). Ekstrinsik apoptotik yolak, TNF- α , FasL ve TRAIL dahil olmak üzere ligandların ve hücre yüzeyinde karşılık

gelen ölüm reseptörlerinin (sırasıyla TNF- α reseptörü 1, Fas/CD95/APO1 ve TRAIL-R) kombinasyonu ile tetiklenir. İskemik inme durumunda reseptör, prokaspaz-8' e bağlanarak bir kompleks oluşturan ölüm alanı adaptör proteinleri (Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ve tümör nekroz faktörü reseptörü tip-1-ilişkili ölüm alanını (TRADD)) aktive eder. Bu kompleks, çeşitli zarar veren süreçleri indükler ve sonunda kaspaz-8' in aktivasyonuna yol açar. Bir kez aktive edildikten sonra, kaspaz-8, doğrudan proteolitik bölünme yoluyla veya dolaylı olarak BH3-etkileşen bölgeyi (BID) apoptotik olarak mitokondriye bağlı yolak ile hücre ölümüne yol açar. Ayrıca, iskemik hasar sırasında nöronlar ve glial hücreler TNF- α salgılar, Fas mRNA ve protein seviyelerini artırır. Bunlar dışsal apoptotik yol için uyarılar olarak işlev görebilir ve nihayetinde nöronal ölüme neden olur (Datta ve ark., 2020; Qin ve ark., 2022).

3.6.1.2. İnstrinsik Yolak

İnstrinsik yolak mitokondriye bağlıdır; Bax gibi pro-apoptotik ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler apoptotik düzenleyiciler olarak görev alır. Mitokondriyal fonksiyonu bozan I/R, ultraviyole, radyasyon, proteolitik olaylar gibi apoptotik uyarılar aşırı ROS üretimine yol açar. Ayrıca ROS miktarı mitokondri tarafından enerji metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da ortamda artar. İskemik ortamın reperfüzyonu üzerine, ROS hücre ortamına dahil edilir ve içsel apoptotik yolu aktive eder.

Mitokondriyal disfonksiyon, I/R sırasındaki aşırı Ca^{2+} artışından ve enerji tükenmesinden kaynaklanır. Mitokondriyal Ca^{2+} aşırı artışı ve enerji tükenmesine yol açan patolojik uyarılar, mPTP açılmasını etkinleştiren olayları başlatır. Bu eylem, pro-apoptotik bir sitosolik protein olan Bax'in dış mitokondriyal membrana translokasyonuna ve multimerizasyonuna neden olur (Voss ve Strasser, 2020). Fizyolojik olarak bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2, dış mitokondriyal membranda lokalize olur, membran

DNA hasarı, UV ve γ -ışınlama, ROS ve diğer hücre içi stres sinyalleri, BCL-2 protein ailesi aracılığıyla düzenlenen mitokondriden sitokrom c salınımına yol açar. Bu süreç apoptozun içsel yolunu başlatan ilk adımıdır. Sitozolik sitokrom c, Apaf-1 proteinine bağlanarak kapalı otomatik inhibe konformasyonunu çözer. ATP ile sitokrom c bağlanmasına ve ADP değişimine yanıt olarak, Apaf-1 bir heptamerikkuaterner yapı oluşturur ve böylece inaktif prokaspaz-9 moleküllerini aktive eder. Apoptozom olarak bilinen bu mega kompleks hücre ölümüyle sonuçlanan apoptoz sürecine neden olur (De Zio ve ark., 2015).

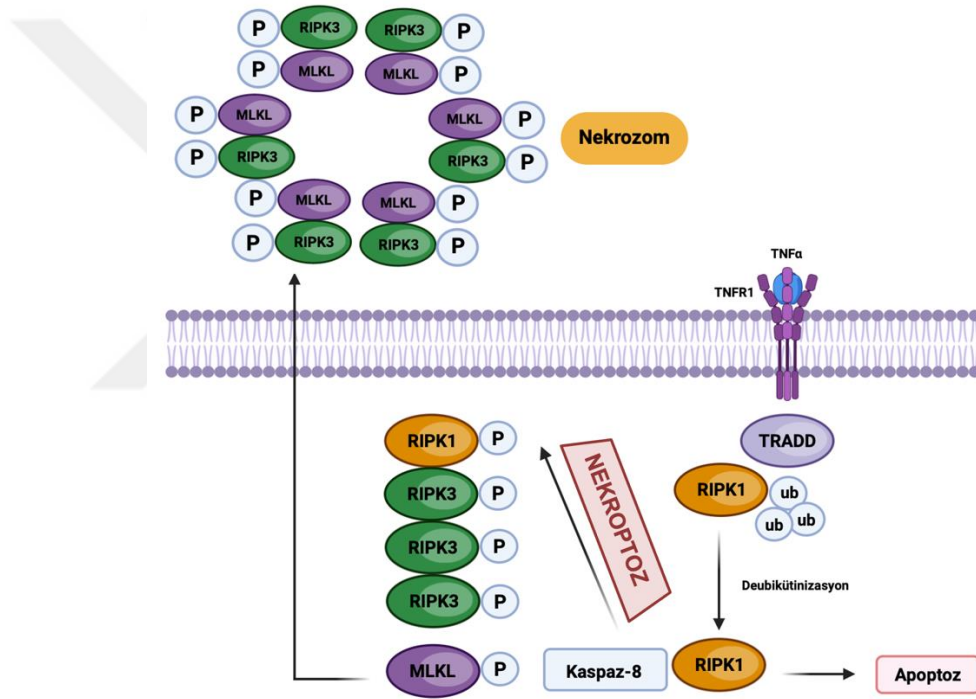
Apaf-1'in yukarı regülasyonu, artmış nöronal hücre ölümü, yani nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili patolojilerde yaygın bir fenomen olarak ortaya çıkmamıştır. Apaf-1'in içsel apoptotik yolun aktivasyonunda merkezi bir molekül olduğu göz önüne alındığında, Apaf-1'in aşağı düzenlenmesi kaçınılmaz olarak kanser ve nörodejeneratif bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla bağlantılıdır. Bu nedenle, Apaf-1 fonksiyonunun ve düzenlenmesinin ayrıntılı olarak anlaşılması, bu koşullara yönelik daha iyi tedaviler tasarlamak için esastır (Shakeri ve ark., 2021).

3.6.2. Nekroptoz

Nekroptoz, hücre zarı bozulmasıyla karakterize edilen düzenlenmiş bir nekroz olarak tanımlanan hücre ölüm türüdür (Hribljan ve ark., 2019). 2000'li yılların başlarından bu yana yapılan çalışmalarda nekroptoz olarak bilinen nekrotik programlanmış hücre ölüm yoluna memelilerin ve daha yüksek omurgalıların genomlarında kodlanmış RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin aracılık ettiği gösterilmiştir (Yuan ve Ofengeim, 2023).

Nekroptoz, aktif kaspaz-8 yokluğunda RIPK1 tarafından RIPK3 aktivasyonuna yol açan ölüm reseptörleri (Fas/FasL), Toll benzeri reseptörler (TLR4 ve TLR3), tip I interferon (IFN-I) ve TNF α 'nın aktivasyonu ile tetiklenir. Bu aktivasyon NF κ B' ya bağlı

proinflatuar ve prosurvival sinyallerin oluşmasına neden olur. Aktive edilmiş RIPK1, nekrozom adı verilen bölgede RIPK3'e bağlanır ve burada karşılıklı oto ve trans fosforilasyona uğrar. Fosforile edilmiş RIPK3, MLKL'ye bağlanır ve onun fosforilasyona uğramasına neden olur. Böylece MLKL oligomerleri oluşur; bu oligomerler plazma membranına giderek membranda spesifik fosfatidilinositol fosfat türlerine bağlanır ve dolayısıyla plazma membranı geçirgenliğini tetikler. Bu süreç nekroptoz adı verilen hücre ölümü ile tamamlanır (Bertheloot ve ark., 2021).



Şekil 6. Nekroptoz yolağının şematik gösterimi (Datta ve ark., 2020)

3.6.2.1. RIPK3

RIPK3 serin/treonin kinaz aktivitesini ve MLKL'nin fosforilasyonunu tetikleyen, protein içeren RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM) yoluyla RIPK3 oligomerizasyonudur. Örneğin, TNFR1 (RIPK1), TLR3, TLR4 (TRIF) ve DAI'nin

kendisinin sinyal bileşenlerini içeren RHIM, nekroptotik ölümü tetiklemek için RIPK3 ile RHIM-RHIM etkileşimleri oluşturabilir. Benzer şekilde, RIPK3'ün yapay dimerizasyonu/oligomerizasyonu, herhangi bir yukarı akış sinyali olmadığında MLKL'nin aktivasyonuna ve alımına neden olmak için doğrudan yeterlidir (Murphy ve Vince, 2015).

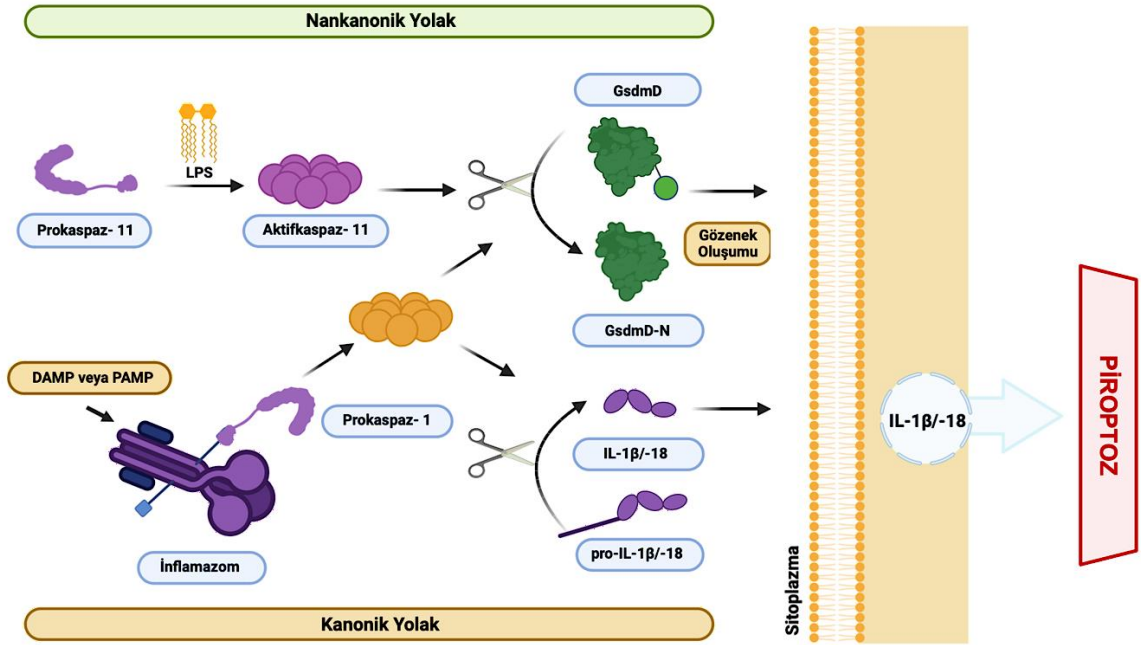
RIPK1 ve RIPK3 RHIM'lerin etkileşimi, büyük bir amiloid benzeri nekrozom sinyal platformunun oluşumunu indükler. Son çalışmalar, RIPK1-RIPK3 heterodimerlerinin nekroptozu tetiklemek için yeterli olmadığını ve bunun yerine nekrozom kompleksi içinde RIPK3 homooligomer oluşumunun RIPK3 aktivasyonu, intramoleküler RIPK3 fosforilasyon ve MLKL alımı için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu model, *in vivo* RIPK1'in silinmesinin RIPK3-MLKL kaynaklı nekroptozu tetikleyebileceğini gösteren son genetik çalışmalara uyar. Çünkü RIPK1 kaybı RIPK3 oligomerizasyon eğilimini artırabilir. Aktif RIPK3 fosforilatları MLKL uyararak MLKL'nin fosfolipid membranlarıyla ilişkisine ve bozulmasına izin verir. RIPK3 kinaz aktivitesini çeşitli inhibitörlerle hedeflemek, nekroptotik kaynaklı hastalıkların tedavisi için bir strateji olabilir (Newton ve ark., 2014).

3.6.3. Piroptoz

Proinflamatuvar programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için araştırmacılar Yunanca piro (ateş) ve ptoz (to-sis, düşme) anlamına gelen piroptoz terimini kullanmışlardır. Piroptoz enfeksiyon ve stresle ilişki sinyallere karşı fizyolojik sistemlerin savunması için kritik öneme sahiptir (Yu ve ark., 2021).

Piroptoz için iki ana yol vardır: kanonik ve nonkanonik piroptoz. Her iki yol da Gasdermin D'yi (GsdmD) aşağı akış efektörü olarak kullanır. Kanonik yol, hem patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler) hem de hasarla ilişkili moleküler kalıpları

(DAMP'ler) ve son zamanlarda homeostaz değiştiren moleküler özellikler (HAMP'ler) olarak adlandırılan sitoplazmik bozuklukları ile tetiklenir. PAMP'ler ve DAMP'ler hücre içinde sitoplazmik örüntü tanıma reseptörleri tarafından tanınır ve bunların aktivasyonu piroptozu gerçekleştirmek üzere inflamazom kompleksini bir araya getirir. Buna karşılık, HAMP'ların tanınması, sitoplazmik homeostazı bozan moleküler süreçlerin, örneğin pyrin inflamazomunun fosforilasyonunun tespit edilmesi yoluyla gerçekleşir (Oladapo ve ark., 2024). Genel olarak, bir PAMP veya DAMP'ın bağlanması, Örüntü tanıma reseptörleri (PRR) apoptozla ilişkili benek benzeri protein (ASC) ile etkileşime girer ve aktive eder, bu protein daha sonra oligomerleşir ve pro-kaspaz 1'e bağlanmak için kaspaz aktivasyon ve iře alım alanını (CARD) kullanır. PRR'ler, ASC ve Pro-kaspaz 1'in bağlanma kompleksi inflamazom olarak adlandırılır. CARD-CARD etkileşimi, GsdmD ve pro-IL-1 β /IL-18'i aktif formlarına ayırmak için pro-kaspaz 1'in aktivasyonunu tetikleyerek piroptozu başlatır. (Liu et ve ark., 2016). Nonkanonik yolak, Gram-negatif bakterilerin hücre iči lipopolisakkaritleri (LPS) ile tetiklenir. LPS, CARD'a bağlanarak Pro-kaspaz 11'i (insanlarda Pro-kaspaz 4/5) doğrudan aktive eder, bu da kaspazın oligomerizasyonu ve otoproteoliziyle sonuçlanır. Kaspaz 1'e benzer şekilde, aktif Kaspaz 11, GsdmD-N ve GsdmD-C'yi ayırmak için GsdmD'nin bağlayıcı bölgesini keserek piroptozu başlatır (K. Wang ve ark., 2020). Nonkanonik yolak, NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain iğeren 3 (NLRP3) aracılığıyla kanonik yolakla çapraz bağ kurar, bu da pro-IL-1 β /IL-18'i parçalamak için kaspaz 1'i aktive ederek enflamasyonu teşvik eder. Bu olaylar toplu olarak, membran bozulmasıyla hücre ölümü ve GsdmD-N porları yoluyla sitokinlerin salınması gibi aşağı yönlü etkileri tetikler (Burdette ve ark., 2021). Çalışmalar son zamanlarda piroptozun inme sonrası nöroinflamasyona aracılık ettiğini ve potansiyel terapötik hedefler olarak piroptozla ilgili yolları önerdiğini göstermiştir (Long ve ark., 2023).



Şekil 7. Piroptoz Yolağının Şematik Gösterimi (Burdette ve ark., 2021)

3.6.3.1. Gasdermin D

2015 yılında yayınlanan bir çalışmada Gsdm kaynaklı gözenek oluşumu ile karakterize edilen piropitoza aracılık eden Gsdm protein ailesinin merkezi rolünü ortaya çıkardı. Bu protein ailesi, insanlarda GsdmA, B, C, D, E (DFNA5 olarak da bilinir) ve DFNB59'u içerirken, farelerde GsdmA (1-3 izoformlu), C (1-4 izoformlu), D, E ve DFNB59'u içerir. Bu evrimsel olarak korunmuş Gsdm proteinleri arasında, GsdmD ve GsdmE, piropitozun temel mekanizmalarını aydınlatan, en kapsamlı olarak çalışılan uygulayıcı proteinler olarak ortaya çıkmıştır (Rao ve ark., 2022).

Gasderminler genellikle N-terminal gözenek oluşturan ve C-terminal inhibitör alanlar arasındaki yakın etkileşimler yoluyla hareketsizliklerini korurlar. Gasderminlerin aktivasyonu, litik veya litik olmayan kaspasları veya granzimleri içeren eksojen veya endojen faktörler tarafından konakçı stimülasyonunun bir sonucu olan proteolitik bölünme yoluyla başlatılır (J. Yan ve ark., 2021). GsdmD tüm enflamatuvar kaspazların

(kaspaz-1 ve kaspaz-4/5/11) ortak substratıdır. Bu aktif kaspazlar, N-terminal ve C-terminal alanları arasında GsdmD'yi keser. GsdmD'nin N-terminal alanı (GsdmD-N) piroptoz indükleyen aktiviteye sahiptir ve IL-1 β ve IL-18 sekresyonunda belirleyici bir rol oynar. GsdmD'nin C-terminal (GsdmD-C) etki alanı bu işlemlere sahip değildir, ancak hücreler GsdmD'yi inaktive durumda tutmak için sessiz bir durumda olduğunda N-terminal etki alanını inhibe eder (Dong ve ark., 2018). Daha sonra, parçalanmış N-terminal gözenek oluşturan fragman, plazma membranı içindeki fosfolipitlere ve kardiyolipine bağlanarak oligomerizasyona ve çapı 10 ila 20 nm arasında değişen büyük ölümüne neden olan gözeneklerin oluşumuna yol açar (Zahid ve ark., 2021).

3.6.4. PANoptoz

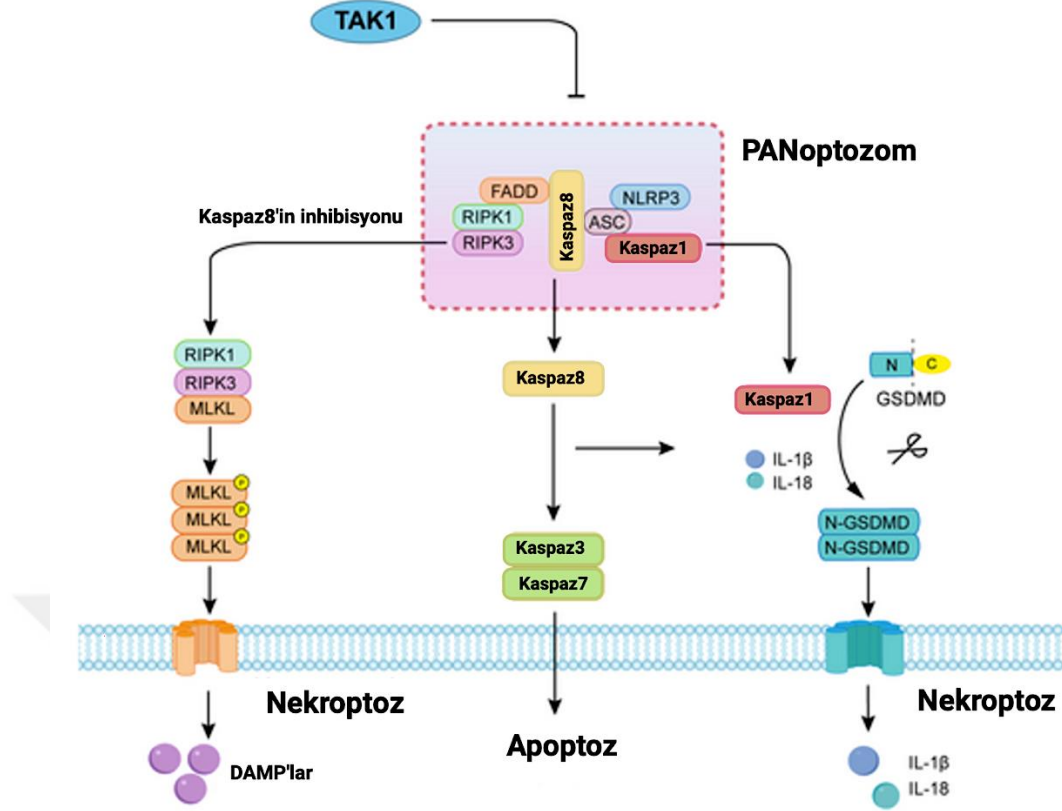
Uzun yıllar boyunca hücre ölüm yollarının çok az veya hiç örtüşme olmadan paralel olarak işlev gördüğü düşünülmüştür. Ancak şu anda “P”iroptoz, “A”poptoz ve “N”ekroptoz’un (PANoptoz) arasında karmaşık bir moleküler ağ olduğu ve birbirini çapraz düzenleyebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Bertheloot ve ark., 2021). PANoptoz, diğer hücre ölüm türlerinden bileşenleri entegre ederek bir araya getirilen çok yönlü PANoptozom komplekslerinin aracılık ettiği, piroptoz, apoptoz ve nekroptoz arasındaki etkileşimleri içeren nispeten yeni bir hücre ölümü modelidir. (Sun ve ark., 2024). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen bulgular, piroptoz, apoptozun ve nekroptozun serebral I/R hasarında aynı anda meydana geldiğini göstermektedir (Yan ve ark., 2022).

Apoptoz ve nekroptoz aynı mekanizmalar tarafından tetiklenebildiğinden, nekroptozun hücre güvenliğini sağlamak için bir “yedek mekanizma” olarak geliştiğine inanılmaktadır. Apoptotik ve nekroptotik yolların aracısı olarak Kaspaz-8, farklı hücre ölümü türleri arasındaki bağlantıyı sağlayan moleküllerden biri olarak bilinmektedir.

Kaspaz-8 sadece apoptozu düzenlemekle kalmaz aynı zamanda nekroptoz için de kritik bir bileşendir. Ölüm reseptörünün aktivitesinin azalması ile birlikte Kaspaz-8'in aktivasyonu apoptozu tetikler, Kaspaz-8'in yokluğu veya farmakolojik blokajı nekroptozu tetikler. İlginç bir şekilde, Kaspaz-8 nekroptoz stabilizasyonunda rol oynuyor gibi görünse de nekroptozu önlemek için proteolitik aktivitesi gereklidir. Bu nedenle, kaspaz-8, hem apoptoz hem de nekroptoz için oldukça önemlidir (Fritsch ve ark., 2019; Newton ve ark., 2019).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Kaspaz-8'in GsdmD'yi doğrudan bölerek NLRP3 aktivasyonunu teşvik ettiğini, böylece piroptozu yol açtığı ve inflamasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Kaspaz-8, RIPK3 kinaz ve MLKL'nin aktifleşmesi için gereklidir. Aktif MLKL, GsdmD'ye benzer şekilde membran bütünlüğü kaybına neden olduğundan, MLKL'ye bağlı K⁺ akışı NLRP3 aktivasyonunu tetikler (Demarco ve ark., 2020).

Bilindiği gibi, Kaspaz-1'in aktivasyonu, GsdmD'nin aracılık ettiği bir süreç olan piroptozu tetikler. Çalışmalar, Kaspaz-1'in BID/Kaspaz-9/Kaspaz-3 ekseni veya diğer yollar aracılığıyla GsdmD eksikliği olan hücrelerde apoptozu indüklediğini bulmuştur (Zhu ve ark., 2023). Piroptotik Kaspaz-1'in GsdmD yokluğunda apoptotik Kaspaz-3'ün bölünmesini indükleyerek apoptotik yolu da aktive edebileceği raporlanmıştır (Wang ve Kanneganti, 2021).



Şekil 8. PANoptoz Yolağının Şematik Gösterimi (Huang ve., 2025)

3.6.4.1. Z-DNA Bağlayıcı Protein 1

Z-DNA bağlayıcı protein 1 (ZBP1), inflamasyon ve hücre ölümü yollarının kritik bir aracısı olarak işlev gören sitozolik bir nükleik asit sensörüdür. Nöroinflamasyon, DAMP'lara yanıt olarak ortaya çıkabileceğinden, ZBP1 inme sonrası nöroinflamasyonda rol oynayabilir (Mutoh ve ark., 2023). ZBP1'in aktivasyonu, hücre ölümü sinyal iskeleleri oluşturmak için RIPK3 ve Kaspaz-8 alımı ile etkileşimini kolaylaştırır. Bu ZBP1-RIPK3-Kaspaz-8 kompleksi PANoptozun aktivasyonunu yönlendirir (Cui ve ark., 2025).

3.6.4.2. Dönüşüm Büyüme Faktörü-beta Aktive Kinaz 1

Dönüşüm büyüme faktörü-beta aktive kinaz 1 (TAK1), farklı iç ve dış uyarılara yanıt verebilen ve enflamatuar ve bağışıklık tepkilerine katılabilen serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Ortaya çıkan kanıtlar, TAK1'in apoptoz, nekroptoz, piroptoz

ve PANoptoz dahil olmak üzere düzenlenmiş hücre ölüm yollarının kesişmesinde önemli bir düzenleyici olduğunu göstermektedir (Huang ve ark., 2025). TAK1, hücre içi sinyal iletiminde kritik rol oynayan bir kinaz olup, özellikle NF- κ B ve MAPK yollarının aktivasyonunda görev almaktadır. Buna ek olarak, DNA hasarı, hipoksi gibi bazı stres koşullarının TAK1'i aktive ettiği gösterilmiştir (Dai ve ark., 2012; Schuman ve ark., 2009).

Fosforile TAK1 (p-TAK1), I κ B kinaz (IKK) kompleksini tetikleyerek NF- κ B yolunun aktivasyonunu başlatır ve bu da anti-apoptotik proteinleri düzenler (Greten ve Karin, 2004).

3.6.5. Ferroptoz

Ferroptoz, demir bağımlı membran lipid peroksidasyonu ile karakterize hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu süreçte ferroptozu indükleyen faktörler, farklı mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak glutatyon peroksidazı etkileyerek antioksidan kapasitesinin azalmasına, hücrelerde ROS birikmesine neden olur ve sonuçta oksidatif hücre ölümüne neden olur. Güncel araştırmalar ferroptozun tümörler, sinir sistemi hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve I/R hasarı gibi birçok hastalığın patofizyolojik süreçleri ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Dixon ve Olzmann, 2024).

Morfolojik olarak ferroptozda plazma zarı bütünlüğünü kaybeder, sitoplazma ve sitoplazmik organeller şişer ve kromatinler kısalıp kalınlaşır. Ferroptoz sürecinde ayrıca, hücrelerde şekil değişikliği olarak dekolman ve yuvarlaklaşma gözlenirken, otofagozom sayısında da artış meydana gelmektedir. Ultrayapısal düzeyde, ferroptotik hücreler genellikle artan hacim ve membran yoğunluğu, azaltılmış veya eksik krista ve dış zarın yırtılması gibi mitokondride belirgin anormallikler gösterir (Riegman ve ark., 2020).

Ferroptoz ile ilişkili mekanizmalar karmaşıktır ve demir, amino asit, lipid metabolizması olmak üzere üç faktör üzerinden araştırılır (Tang ve ark., 2021).

1- Demir Metabolizması

Demirin ferroptozda birden fazla mekanizma ile rol oynadığı düşünülmektedir. Demir seviyelerinin aşırı artışı, Fe^{2+} 'nin Fenton reaksiyonu ile lipid ROS üretmesine neden olarak ferroptozu tetikler. Ayrıca, Fe^{2+} , fosfolipid peroksidlerin biyosentezi için temel enzimler olan LOX ve P450'lerin kofaktörüdür. Fe^{2+} 'nin bu iki fonksiyonu da ferroptozun başlangıcı için kritik öneme sahiptir (Stockwell ve Jiang, 2020; Toyokuni ve ark., 2017).

2- Amino Asit Metabolizması

Amino asit metabolizması ferroptoz ile yakından ilişkilidir. Çoğu durumda, sistein alımı, Glutatyon (GSH) sentezlemek ve Glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4) antioksidan aktivitesini korumak için hücre içi ortamda işlev gören sistin/glutamat antiporterler (sistem xc-) aracılığıyla gerçekleşir (She ve ark., 2020). Sistem xc- antiporter, glutamat karşılığında sistini hücre içine alır. Sitolde sistin hızla sisteine indirgenir. Sistein, GSH'yi sentezlemek için kullanılabilir. GSH, toksik fosfolipid peroksidleri (L-OOH) iyi huylu lipid alkollere (L-OH) dönüştürebilen bir enzim olan GPX4 için kofaktördür. GPX4'e paralel olarak, oksidoredüktaz Ferroptoz baskılayıcı protein-1 (FSP1), radikal yakalama antioksidanların indirgenmiş formunu yenilemek için NADPH kullanır ve bu da fosfolipid peroksid radikallerine (LOO•) elektron bağışlayarak lipid peroksidasyon sürecini sonlandırır (Dixon ve Olzmann, 2024).

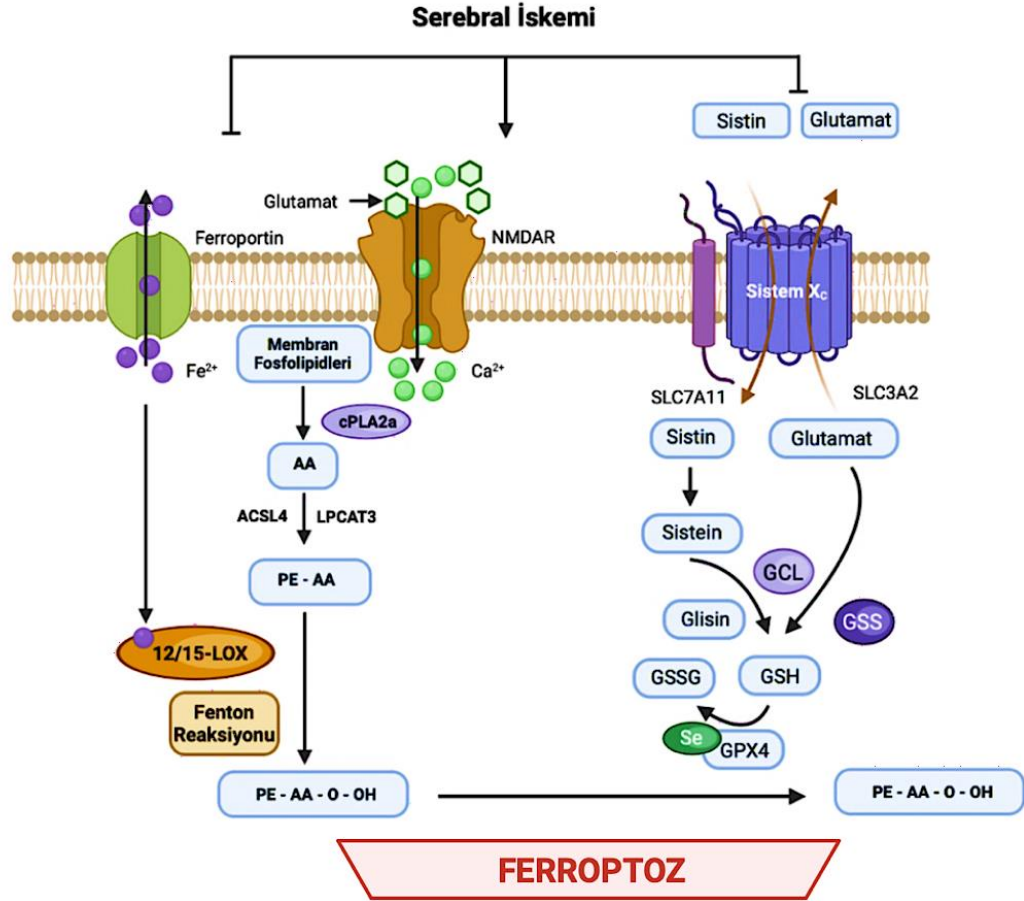
3- Lipid Peroksidasyonu

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), lipid peroksidasyonuna karşı duyarlıdır ve ferroptoz sürecinin temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilir. Serbest PUFA'lar

sentetik lipid sinyal iletim ortamının substratıdır, ancak membran fosfolipitlerine esterleştirilmeleri ve ferroptoz sinyalini iletmeleri için oksitlenmeleri gerekir. Çalışmalar, araşidonik asit (AA) veya türev adrenalin içeren fosfatidiletanolaminin (PE), hücrelerde ferroptozu indükleyen anahtar fosfolipid olduğunu göstermiştir (Li ve ark., 2020). İlk olarak, PUFA'lar membran fosfolipidleri, özellikle fosfatidiletanolamin (PE) ile esterifikasyon reaksiyonuna girer. Esterifikasyon reaksiyonu, Uzun zincirli açil-koenzim A (CoA) sentaz 4 (ACSL4) ve lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3 (LPCAT3) tarafından katalize edilerek AA/AdA-PE oluşumu ile sonuçlanır. Daha sonra, LOX, PE-AA/AdA'yı oksidasyon yoluyla PE-AA/AdA-OH'ye dönüştürür, böylece ferroptozu indükler (Kagan ve ark., 2017).

3.6.5.1. Uzun Zincirli Açil-Koenzim A (CoA) Sentaz 4

ACSL4, hücre zarlarının fosfolipid bileşimini yeniden şekillendirir ve ferroptozun pozitif düzenleyicisidir. Farklı organeller arasında farklı biyokimyasal süreçlerde yer alır. Mitokondri içinde, ACSL4 öncelikle yağ asidi sentezine ve β -oksidasyona katkıda bulunur. Peroksidazlar arasında, ACSL4 esas olarak β -oksidasyon ve alkil lipidlerinin sentezinde rol oynar. Endoplazmik retikulumda (ER), β -oksidasyon bozulduğunda orta zincirli yağ asitlerinin katabolizması için birincil yol olarak hizmet eden gliserolipid sentezini teşvik eder. Bu bulgular, ACSL4'ün yağ asidi metabolizmasındaki ve dolayısıyla ferroptozdaki kritik rolünü vurgular (Zio ve ark., 2015).



Şekil 9. Ferroptozun moleküler mekanizması (Tuo ve ark., 2022)

3.7. Sestrin2

Sestrinler oksidatif stres, DNA hasarı ve hipoksi dahil olmak üzere çeşitli stres kaynakları ile indüklenebilir bir protein ailesidir. Sestrin2 (Sesn2), nörodejeneratif bozukluklarda nöroprotektif özellikleri ile öne çıkan bir proteindir (Wang ve ark., 2019). Diğer Sestrinler gibi oksidatif stres, hipoksi, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarı ve mitokondriyal disfonksiyon gibi çevresel streslere yanıt olarak düzeylerinde artış gözlenir. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Sesn2'nin antiinflamatuvar etkisini AMP-bağımlı protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ve rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) sinyalinin hedefinin inhibisyonu yoluyla otofajiyi indükleyerek gösterdiği bilinmektedir (Wang ve ark., 2021(b)). mTORC1'in baskılanmasının nöronal apoptoza

karşı koruduğuna dair kanıtlar göz önüne alındığında, iskemide sestrinlerin aşırı ekspresyonuyla birlikte, sestrinlerin nöronal hücreleri iskemi veya hipoksi kaynaklı apoptozdan korumak için endojen bir terapötik hedef olabileceği düşünülebilir (Shi ve ark., 2016). İskemik hastalıklarda Sesn2'nin koruyucu rolüne olan ilgi giderek artmaktadır. Son çalışmalar, rekombinant insan Sesn2'nin intranasal uygulamasının yenidoğan hipoksik iskemik ensefalopatide enfarktüsü boyutunu, beyin atrofisini, apoptozu azalttığını, ventriküler alanı artırdığını ve nörolojik işlevi iyileştirdiğini göstermiştir (Shi ve ark., 2017). Deneysel travmatik beyin hasarı, iskemik inme veya subaraknoid kanamanın neden olduğu akut beyin hasarından sonra, nöronlar ve mikroglia ile Sesn2 ifadeleri önemli ölçüde arttığını raporlayan çalışmalar mevcuttur. Sesn2'nin aşırı ekspresyonu oksidatif hasarı anlamlı olarak azalttığı, nöroinflamatuvar hakaretleri ve kan-beyin bariyeri bozulmasını hafiflettiği, nöronal apoptozu baskıladığı ve böylece nörolojik işlevi iyileştirdiği de bu çalışmalarda elde edilen bulgular arasındadır (Dou ve ark., 2023; Yang ve ark., 2023). Bu bulgular, Sesn2'in nöroprotektif olduğunu desteklemektedir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda Sesn2'nin mitofajları indükleyerek ve makrofajlarda NLRP3 aktivasyonunu inhibe ederek sepsisi baskıladığı bildirilmiştir (Wu ve ark., 2021). Ancak serebral I/R hasarında hücre ölüm yollarının düzenlenmesi, hücrel homeostazın sürdürülmesindeki rolü alta yatan mekanizma ve PostC ve RePostC'nin Sesn2 düzeylerine etkisi belirsizliğini korumaktadır.

3.8. Mitokondrial Heksokinaz II

Beyin enerji tüketirken ağırlıklı olarak glikozu yakıt olarak kullanır. Glukozun glikoz-6-fosfata fosforilasyonunu katalize eden heksokinaz (HK), glukoz kullanımında ilk hız sınırlayıcı enzimdir. Farklı biyokimyasal özelliklere ve katalitik aktivitelere sahip

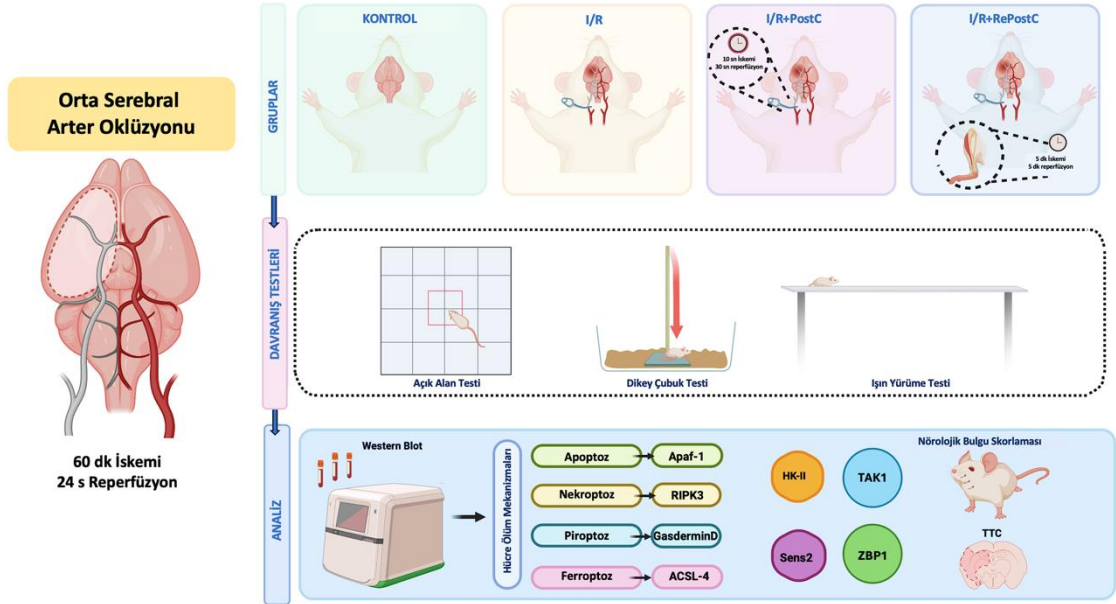
dört ana HK izozimi, HK1, HK2, HK3 ve HK4 tanımlanmıştır (Hu ve ark., 2022). HK 1, 3 ve 4 esas olarak yetişkinlerde farklılaşmış dokularda işlevlerini yerine getirirken, HKII tipik olarak patolojik ortamlarda indüklenir. HK-II, otofaji düzenlemesi, hücre ölümü ve diğer fizyolojik ve patolojik durumda işlevleri olan glikolizde önemli bir moleküldür (Li ve ark., 2018). Son çalışmalar, HK'ye bağlı glikolizin inflammatuar aktivasyonunu teşvik ettiğini ve HK'lerin bağışıklık tepkilerini düzenlemede katılımı için bir ipucu sağladığını öne sürmüştür.

İskemik inme modelinde, HK-II ablasyonunun enflammatuar tepkileri ve beyin hasarını ağırlaştırdığı gösterilmiştir. HK-II delesyonunu takip eden pro-inflammatuar etkiler, bozulmuş mitokondriyal fonksiyon ve ROS birikimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Hu ve ark., 2022).

HK-II, sitozolde olduğu kadar mitokondriyal bağlanma motiflerinde de lokalizedir ve mitokondrilerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü HK-II bağlanması için gereklidir. HK-II, dış mitokondriyal membranındaki voltaj bağımlı anyon kanalı 1 (VDAC-1) ile bağlanır ve dış ve iç membranlar arasında bir temas bölgesi oluşturan adenin nükleotid taşıyıcısı ile etkileşime girer. Bu kompleks, iç mitokondriyal membranın geçirgenlik bariyeri ve ATP sentezini yönlendirmek için elektrokimyasal gradyanların oluşturulması için gereklidir. Mitokondriyal HK-II, glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondriyal işlevi korur ve mPTP açıklığını inhibe ederek hücre apoptozunu azalttığı bilinmektedir. Ancak serebral I/R hasarında iskemik ardkoşullanma ve uzak iskemik ardkoşullanmanın mitokondriyal HK-II üzerine etkileri ile ilgili bilgiler sınırlıdır.

Bu çalışmada serebral I/R hasarında apoptoz (Apaf-1), nekroptoz (RIPK3), piroptoz (Gasdermin D) ve ferroptozun (ACSL-4) rolünün araştırılması, PostC ve RePostC'in bu moleküller ile Sesn2 ve mitokondriyal HK-II düzeyleri üzerine etkilerinin

ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca uygulanan tedavi metodlarının lökomotor aktivite üzerine etkilerini araştırmak için açık alan, dikey çubuk ve kiriş yürüme testleri gerçekteşirilmiştir. Tez çalışması Şekil 10’da Şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Çalışma amacının Şematik gösterimi

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları

Çalışma protokolü, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından 21.06.2023 tarihli ve 2023/12-07 sayılı karar ile etik onay almıştır. Deney hayvanları, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edildi. Çalışma öncesi “Web tabanlı örneklem büyüklüğü & güç analizi yazılımı” (Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, 2018) ile yapılan örneklem büyüklüğü analizi, her grupta 6 olmak üzere parametrelerin değerlendirilmesinde en az 24 sıçanın çalışmaya dahil edilmesi gerektiğini gösterdi (%80 güç, $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$). Çalışmanın gücünü arttırmak ve cerrahi tekniğin riskine bağlı ölümlerle hayvan sayısını optimumda tutabilmek için toplam 40 adet sıçan kullanıldı. Çalışmaya 10-12 haftalık, erkek Sprague-Dawley ırkı sıçanlar dahil edildi. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık siklusta, havalandırılmalı, sabit ısı (21±1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm’ lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

Anestezi protokolünde ketamin hidroklorür (Ketalar 500 mg/mL, Pfizer, İstanbul) ve ksilazin (Rompun %2, Bayer, İstanbul) kullanılmıştır. Western blot analizlerinde kullanılan antikolar ve kitler ABclonal Technology firmasından temin edilmiştir.

4.2. Deney Grupları

Çalışmada kullanılacak tüm sıçanlar tartılarak ağırlık olarak büyüklükleri birbirlerine en yakın olacak şekilde Kontrol Grubu (n=10), İskemi- reperfüzyon uygulanan sıçanlar (n=10), İskemi-reperfüzyon ve ardkoşullanma tedavisi uygulanan sıçanlar (n=10), İskemi-reperfüzyon ve uzak iskemik ardkoşullanma tedavisi uygulanan

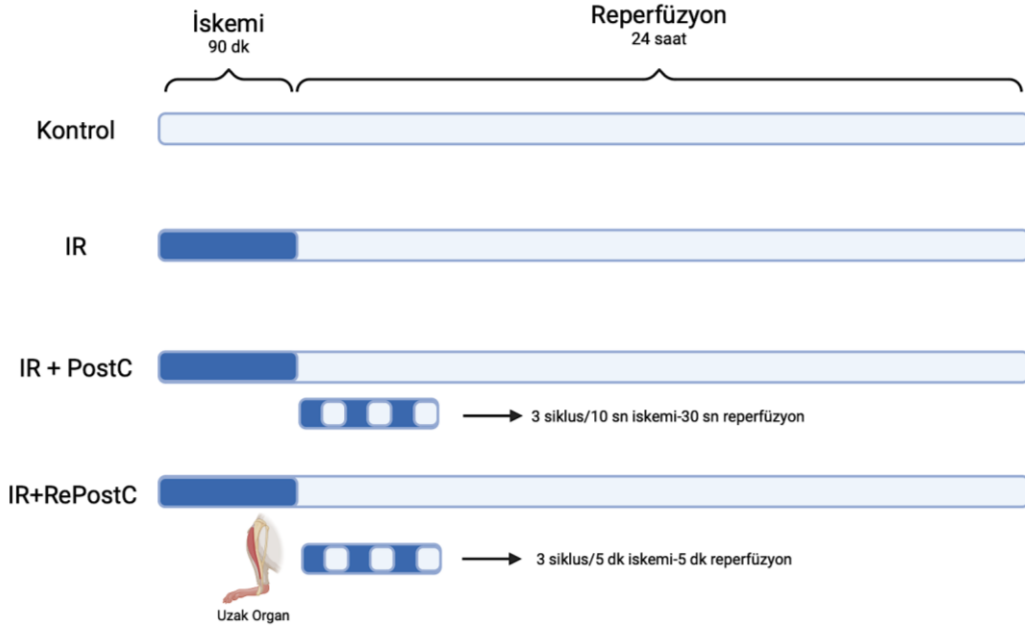
sıçanlar (n=10) olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın deneysel grupları şekil 10'da şematize edildi.

Grup 1- Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlara sham serebral I/R cerrahi operasyonları gerçekleştirildi (Damarın oklüzyonu dışındaki bütün cerrahi operasyonlar gerçekleştirildi). Ayrıca diğer gruptaki hayvanlarla eşzamanlı olarak nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.

Grup 2 – İskemi Reperfüzyon Grubu: Bu gruptaki hayvanlara intraluminal filament tekniği ile deneysel serebral iskemi modeli oluşturuldu ve serebral iskemi sonrası 24 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Serebral iskemiden 24 saat sonra TTC boyama, nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.

Grup 3 - İskemi-reperfüzyon ve Ardkoşullanma Grubu: Bu gruptaki hayvanlara intraluminal filament tekniği ile deneysel serebral iskemi modeli oluşturuldu ve serebral iskemi sonrası reperfüzyon başlangıcında 3 siklus 30 sn reperfüzyon ardından 10 saniye iskemi uygulandı. İşlem tamamlandıktan sonra 24 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Serebral iskemiden 24 saat sonra nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.

Grup 4 - İskemi-reperfüzyon ve Uzak İskemik Ardkoşullanma Grubu: Bu gruptaki hayvanlara intraluminal filament tekniği ile deneysel serebral iskemi oluşturuldu ve serebral iskemi sonrası reperfüzyon başlangıcında sağ arka bacağın femoral arterine 3 siklus 5 dk iskemi ardından 5 dk reperfüzyon uygulandı. İşlem tamamlandıktan sonra 24 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Serebral iskemiden 24 saat sonra nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.



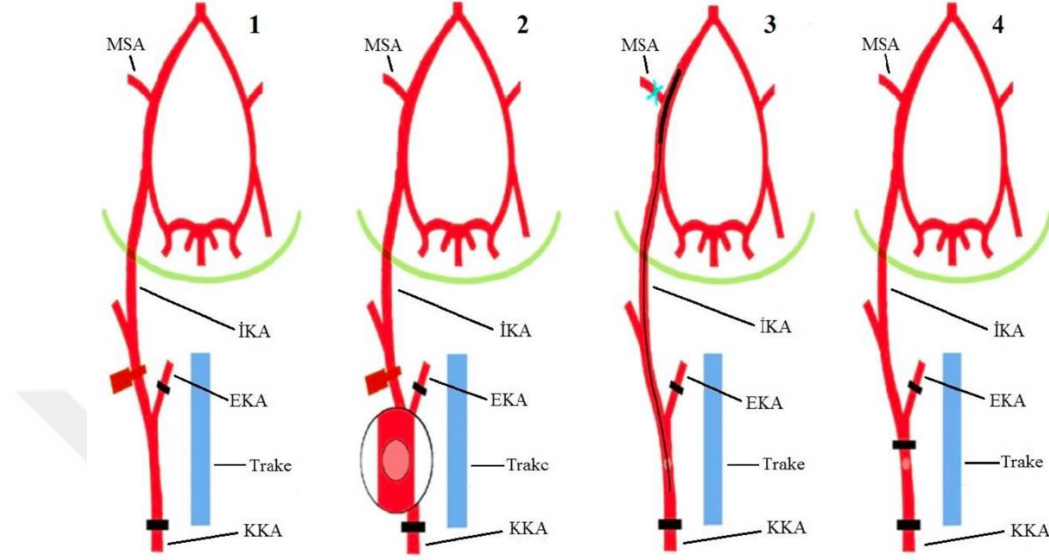
Şekil 11. Deney grupları

4.3. Cerrahi Uygulamalar

Sıçanlar spontan olarak solunumları ve göz kırpmaya refleksi korunacak şekilde 70 mg/kg ketamin, 8 mg/kg ksilazin (Gul-Kahraman ve ark., 2019) intramuskuler uygulanarak anestezi altına alındı. Spontan hareketleri kaybolan ve solunumları kontrol edilen sıçanların anesteziye girip girmediği parmak kısırtma refleksi ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda saptandı. Anesteziye giren hayvanlar cildin görünür hale gelmesi için boyunda 3x4 cm²'lik bölgesi tıraş edildi. Görünür hale gelen cilt bölgesi povidon iyot solüsyonu ve %70'lik etanol kullanılarak dezenfekte edildi. Cerrahi alan dışında kalan bölgeler spanç ile kapatılarak cerrahi işlemler uygulanmaya başlandı.

Cerrahi girişimlere, hayvanlar ağrıya yanıt vermeyecek düzeyde anestezi altına alındıktan ve spontan solunumları korunacak şekilde stabilize edildikten sonra başlandı. Deney süresince rektal yolla izlenen vücut sıcaklıkları 36.5–37 °C aralığında sabit tutuldu. Literatürde iskemik inmelerin yaklaşık %80'inin OSA bölgesinde meydana geldiği bildirilmiş olup, bu nedenle deneysel inme modelleri sıklıkla OSA oklüzyonuna

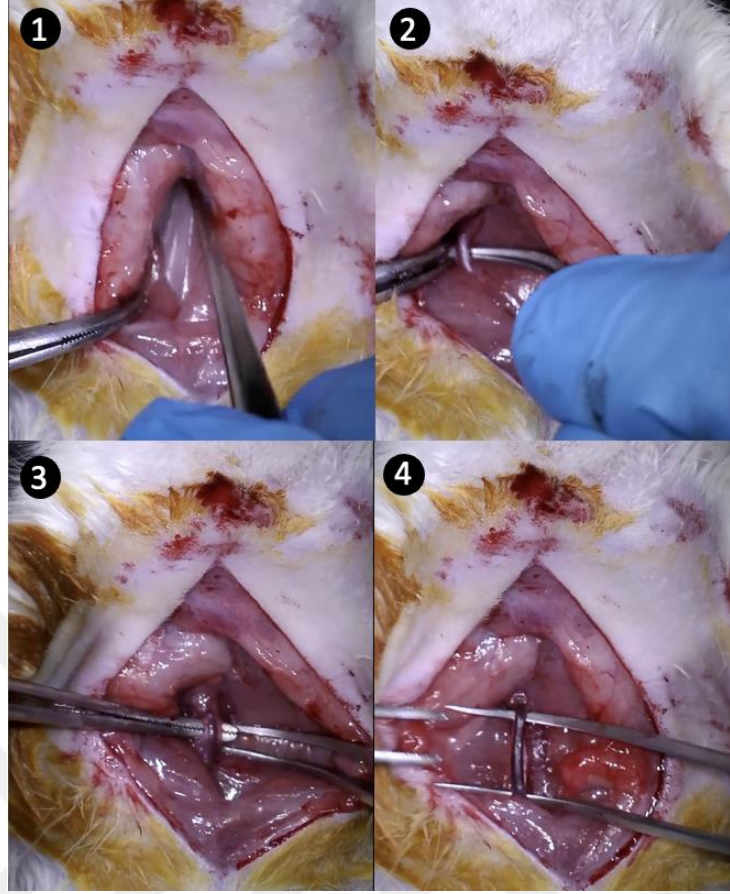
odaklanmaktadır (Crupi ve ark., 2018). Bu çalışmada fokal serebral iskemi modeli, Koizumi'nin tanımladığı intraluminal filament yöntemi kullanılarak sağ orta serebral arterin (OSA) oklüzyonu yoluyla oluşturulmuştur (Şekil 11).



Şekil 12. Middle serebral arterin tıkanmasının şematik görüntüsü (Yılmaz, 2020)

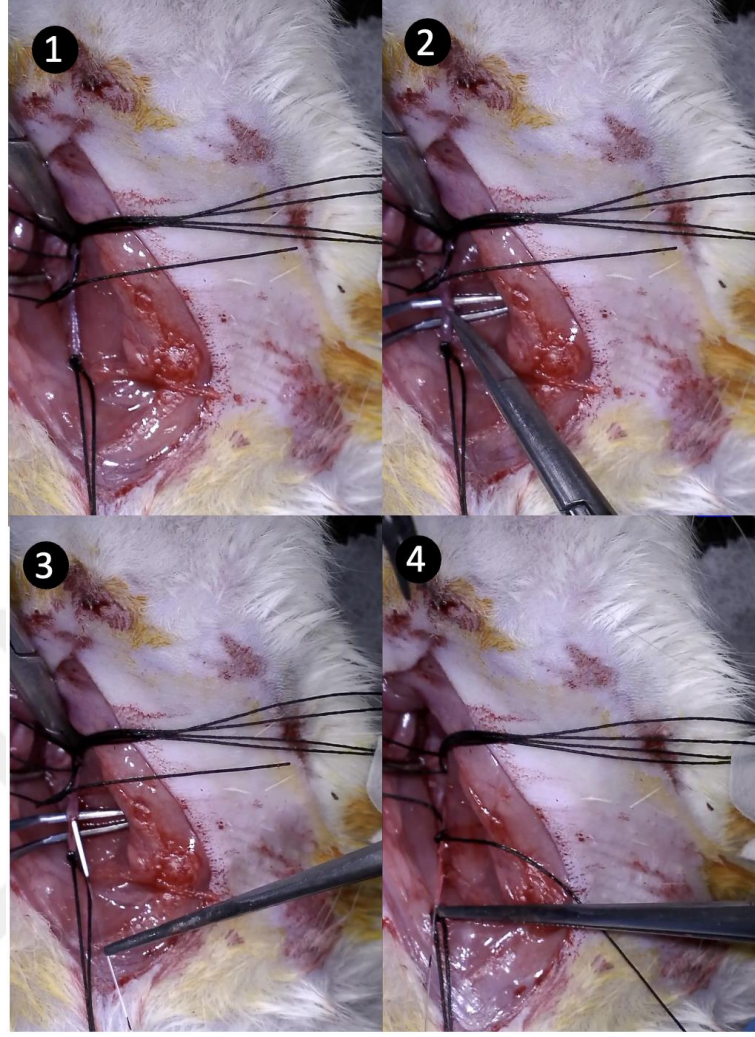
(MSA: Orta serebral arter, İKA: İnternal karotid arter, EKA: Eksternal karotid arter, KKA: Kommon karotid arter)

Koizumi intraluminal filament tekniği uygulanarak fokal serebral iskemi modeli oluşturulmadan önce, deney hayvanları sırtüstü pozisyonda uygun şekilde yerleştirildi. Orta hattın yaklaşık 5 mm lateralinden başlayarak, vertikal doğrultuda 3 cm uzunluğunda bir cilt insizyonu gerçekleştirilmiş ve subkutan dokular geçilerek superfisyel fasyaya ulaşıldı. Superfisyel fasyanın altında lateralde glandüler doku ve medialde de bir üçgen oluşturan sternohyoid, diğastrik, sternomastoid kasları saptanarak keskin diseksiyon ile bu üçgenin içerisine doğru derinleştirildi. Derinde sağ arteria karotis kommunis, karotid bifurkasyonu, eksternal karotid arter ve internal karotid arter çevre dokulardan diseke edilerek belirgin hale getirildi. Arteria karotis kommunis ve internal karotid arterin lateralinde devam etmekte olan nervus vagus belirlenerek hiç zarar verilmeden hassas ve keskin bir diseksiyon ile izole edildi (Şekil 12).



Şekil 13. Kamon Karotid arterin belirlenerek nervus vagustan izole edilmesi

Cerrahi prosedür sırasında, arteria carotis communis proksimalden ve arteria carotis externa distalden 5-0 ipek sûtür ile ligagate edildi. Daha sonra, internal karotid arter üzerine geçici bir mikrovasküler klemp yerleştirildi ve internal-eksternal bifurkasyonun yaklaşık 1 mm proksimalinden arteria carotis communis'e arteriotomi yapıldı. Middle serebral arterin oklüzyonunu sağlamak amacıyla, ucu silikon ve sertleştirici madde ile küntleştirilmiş ve kalınlaştırılmış, yaklaşık 0.39 mm çapında 4/0 naylon bir filament bu açıklıktan vasküler lümeneye yerleştirilerek arteria carotis interna boyunca dikkatli biçimde ilerletildi. Daha sonra internal karotid artere yerleştirilen klemp çıkarılmış ve filament, orta serebral arter segmentine ulaşıldığını gösteren hafif bir direnç hissedilene kadar (yaklaşık 18–20 mm) intraluminal olarak ilerletildi (Şekil 13).



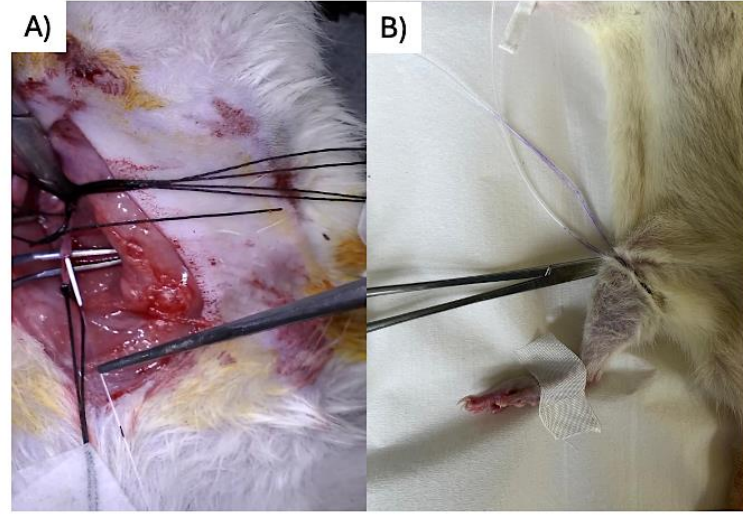
Şekil 14. Deneysel fokal serebral iskemi modelinin oluşturulma aşamaları

(1-İnternal karotid artere klemp yapılması, 2-Kommon karotid artere arteriotomi yapılması, 3-Kommon karotid artere yapılan arteriotomiye filamentin yerleştirilmesi,4-Filamentin kommon karotid arterden middle serebral artere doğru ilerletilmesi)

Her sıçan için tüm prosedür ortalama 20 25 dakikada tamamlandı. Naylon filament 60 dk boyunca bekletilmek suretiyle iskemi oluşturuldu ve daha sonra filament geri çekilerek reperfüzyon sağlandı.

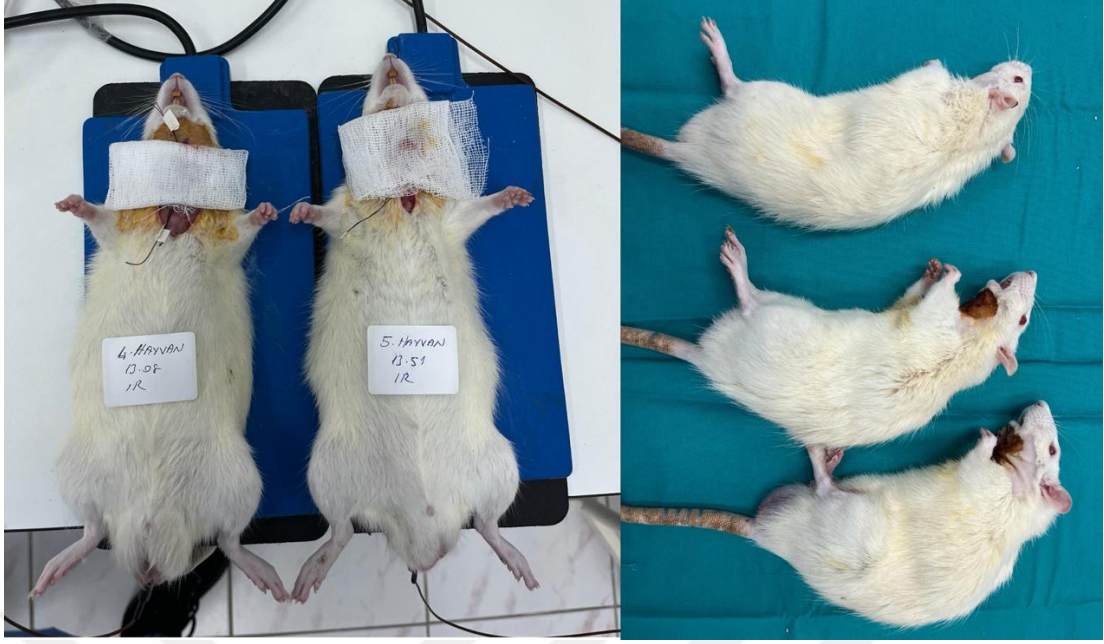
Kontrol grubundaki sıçanlara da filamentin OSA'ya gönderilmesi dışında tüm cerrahi prosedür uygulandı. PostC grubuna reperfüzyon başlangıcında OSA'ya 3 siklus halinde 30 saniye reperfüzyon ve ardından 10 saniye iskemi uygulandı. RePostC ise

reperfüzyon başlangıcında sıçanın sağ arka bacağına femoral arterine 3 siklus 5 dakika reperfüzyon ve 5 dakika iskemi şeklinde uygulandı (Şekil 15).



Şekil 15. PostC (A) ve RePostC (B) uygulamaları

60 dakika sonunda hayvanların uyanması sırasında sol ön ayaklarındaki fleksiyon ve kontralateral kendi etrafında dönme hareketleri gözlemlendi. İskemi olduğu doğrulandıktan sonra tekrardan hafif bir anestezi uygulandı ve cerrahi insizyon bölgesi tekrar dezenfekte edildi. Hayvanlar hala anestezi altındayken sütür atıldı ve anesteziden uyanan hayvanlar uygun şekilde kafeslerine alındı. Son olarak her bir hayvana intraperitoneal olarak verilen 10 cc % 0.9'luk serum fizyolojik solüsyon ile de hidrasyon sağlandı ve cerrahi işlem sonlandırıldı (Yulug ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2014) (Şekil 16).



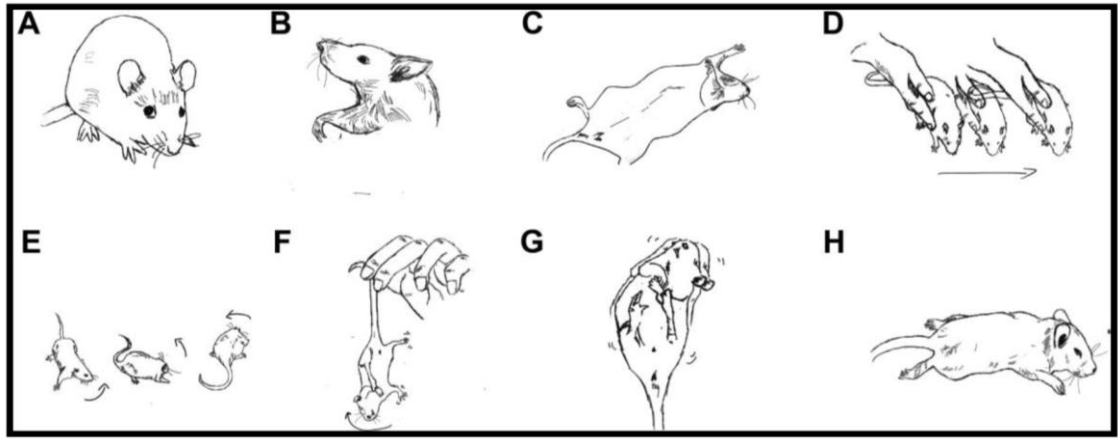
Şekil 16. İskemi ve reperfüzyon aşamalarında takibi yapılan sıçanlar

4.4. Nörolojik Defisit Skorlaması

Nörolojik değerlendirme testi, Bederson skorlama metodunun modifiye edilmiş hali esas alınarak gerçekleştirildi. Reperfüzyonun başlamasından yaklaşık 22–24 saat sonra, tüm deney gruplarındaki hayvanlara nörolojik muayene uygulanmıştır. Bu yöntem, motor fonksiyonlardaki bozulmaları değerlendirmek amacıyla geliştirilmiş olup, post-iskemik nörolojik defisitlerin kantitatif olarak belirlenmesini sağlar. Bederson skorlama metoduna göre (Abe ve ark., 2009):

Tablo 2. Bederson skorlama metodu

0 puan	Normal nörolojik muayene
1 puan	Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında kontralateral ön ayakta fleksiyon
2 puan	Kontralateral ön ayakta fleksiyon ve lateral itmeye karşı azalmış direnç
3 puan	Yürürken kontralateral yöne doğru daire çizme
4 puan	Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında dönme hareketi veya nöbet aktivitesi
5 puan	Spontan olarak yürüyememe



Şekil 17. Sıçanlarda kullanılan nörolojik defisit skoru (Zhang ve ark., 2016)

(A) Herhangi bir defisit bulunmayan sıçanlar, B) Ön bacağın fleksiyonunun bileğini etkilediği sıçanlar veya C) omzunu etkileyen sıçanlar, D) Ön ayağın fleksiyonu ve lateral itmeye karşı direnci azalmış sıçanlar, E) Defisit olduğu tarafa tek yönlü daire çizen sıçanlar, F) Uzunlamasına seğirme yapan sıçanlar veya G) nöbet geçiren sıçanlar, H) hareket etmeyen sıçanlar)

4.5. Davranış Testleri

OSA oklüzyonunu takiben 22–24 saat sonra lökomotor aktivite, denge ve motor koordinasyonu değerlendirmek amacıyla Açık Alan Testi (Open Field Test), Dikey Çubuk Testi (Vertical Pole Test) ve Kiriş Yürüme Testi (Beam Walking Test) uygulandı.

4.5.1. Açık Alan Testi (Open Field)

Spontan lökomotor aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla, tabanı $80 \times 80 \text{ cm}^2$ boyutlarında ve yüzeyi 25 eşit kareye bölünmüş, duvar yüksekliği 40 cm olan bir açık alan düzeneği kullanıldı. Her hayvan, test başlangıcında düzeneğin merkezine yerleştirildi ve hareketleri 10 dakika boyunca dijital olarak kaydedildi. Hayvanın geçiş yaptığı kare sayısı lökomotor aktivite göstergesi olarak değerlendirildi. Testler arasında olası koku ve kalıntıların etkisini önlemek amacıyla düzenek her kullanım sonrası %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir.

4.5.2. Dikey Çubuk Testi (Vertical Pole test)

Motor koordinasyon ve denge performansının değerlendirilmesi için sıçanlar, çapı 3 cm ve uzunluğu 150 cm olan, yüzeyi kaymayı önleyici bant ile kaplanmış dikey bir çubuğun üst kısmına yerleştirildi. Her hayvanın çubuk üzerinde kalma süresi maksimum 180 saniye ile sınırlandırıldı ve süre dijital kronometre ile kaydedildi. Bu test, vestibüler-motor disfonksiyon ve denge bozukluklarının saptanmasında kullanılmaktadır (Yun ve ark., 2014).

4.5.3. Kiriş Yürüme Testi (Beam Walking Test)

Denge ve motor koordinasyonun değerlendirilmesinde bir başka test olarak, yerden 50 cm yükseklikte, 120 cm uzunluğunda ve 5 cm çapında, yüzeyi bez bantla kaplı yatay bir çubuk düzeneği kullanıldı. Sıçanlar düzeneğin bir ucuna yerleştirildi ve karşı uca doğru yürüme hareketleri gözlemlendi. Performans, literatürde tanımlanmış standart bir skorlama sistemine göre değerlendirildi (Sweis ve ark., 2016):

0	Sıçan simetrik olarak çubuk üzerinde yürüyebildi
1	Sıçan, etkilenmemiş uzvunu tercihli olarak kullanarak kiriş üzerinde dengeleyip yürüyebildi
2	Sıçan etkilenmemiş uzuvlara dayanarak kiriş üzerinde dengeleyip yürüyebildi
3	Hareket etmeye başladığında, sıçan kiriş üzerinde dengeleme yapamadı
4	Sıçan hemen ışımdan düştü

Her bir sıçan için test üç kez uygulandı. İstatistiksel analiz için ortalama skor değerleri hesaplandı.

4.6. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması

Nörolojik değerlendirme ve davranış testlerinin tamamlanmasının ardından hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Dekapitasyon sonrasında, foramen magnum'u ortaya çıkarmak amacıyla kafatası üzerindeki deri ve kas dokuları makas yardımıyla dikkatli şekilde ayrıldı. Ardından, makasın bir ucu foramen magnum içerisine yerleştirilerek bilateral olarak kafatası kemiği, beyin dokusuna zarar verilmeden kesildi. Açığa çıkarılan kemik parçası bir pens yardımıyla çıkarıldı. Beyin dokusu, foramen magnum altından ucu künt bir pens ile optik ve trigeminal sinir bağlantıları nazikçe kesilerek eksize edildi. Elde edilen beyin dokusu, biyokimyasal analizlere kadar uygun sıcaklık ve koşullarda muhafaza edildi.



Şekil 18. Çıkarılan sıçan beyin dokusu

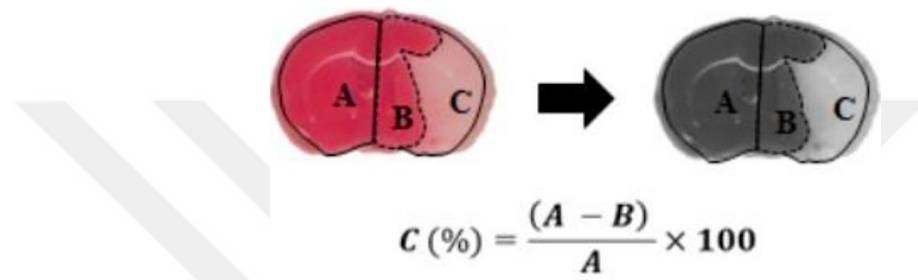
4.7. 2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorid (TTC) Boyama

2,3,5-Trifenil tetrazolium klorür (TTC), beyaz kristal yapıya sahip, suda çözünür bir redoks indikatörü olup, özellikle mitokondriyal enzim aktivitesine bağlı olarak doku canlılığını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. TTC, doku içerisinde bulunan NADH, dehidrogenaz ve diaforaz enzimleri aracılığıyla indirgenerek, kırmızı-pembe renkli 1,3,5-trifenilformazan pigmentine dönüşür. Bu dönüşüm, canlı hücrelerin metabolik aktivitesini yansıtırken, hücresel canlılığını kaybetmiş dokularda enzimatik aktivite bulunmadığından TTC indirgenemez ve bu alanlar boyanmadan açık renkli kalır. Bu özelliğinden dolayı TTC, iskemik doku hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bederson ve ark., 1986).

Serebral iskemi modelinin uygulanmasını ve reperfüzyon sürecinin tamamlanmasını takiben, hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları hızlı bir şekilde çıkartıldı ve kuru buz üzerinde donduruldu. Donmuş beyinler, bregma referans noktası esas alınarak anterior +4 mm ile posterior -6 mm arasında 2 mm aralıklarla toplam altı koronal kesit alındı. Elde edilen doku dilimleri, %1 TTC içeren fosfat tampon solüsyonu (PBS) bulunan petri kaplarına yerleştirildi ve homojen boyanma sağlanması amacıyla 37 °C'de, karanlık koşullarda, etüv içerisinde 10 dakika inkübe edildi. Boyama

sonrasında kesitler, %4'lük formalin çözeltisi içeren ayrı petri kaplarına aktarılarak 12 saat boyunca fiksasyona bırakıldı.

Fiksasyon işleminin ardından, beyin kesitlerinin dijital görüntüleri alınarak bilgisayar ortamına aktarılmış ve ImageJ yazılımı kullanılarak boyanmış ve boyanmamış (infarkt) bölgeler kuantitatif olarak analiz edilmiştir. İnfarkt hacminin hesaplanmasında Şekil 17'de belirtilen formül esas alındı (Park ve ark., 2012).



Şekil 19. İnfarkt alanının hesaplanması (Lee ve ark., 2014)

4.8. Western Blot Analizi

Apaf-1, RIPK3, GsdmD, ACSL4, HK-II ve Sesn2 düzeyleri western blot yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Doku Apaf-1 (ABclonal Technology, Katolog no: A0751), RIPK3 (ABclonal Technology, Katolog no: A5431), Gasdermin D (ABclonal Technology, Katolog no: A23755), ACSL4 (ABclonal Technology, Katolog no: A20414) Sestrin 2 (ABclonal Technology, Katolog no: A23685) ve Heksokinaz 2 düzeylerinin Western blot analizi için ilgili antikolar kullanıldı. Primer antikolar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanılmasının ardından kullanıldı. Nitroselüloz membranlar, antikolar ile +4 °C sıcaklıkta gece boyunca inkübe edildi. Bu işlemin ardından nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika boyunca tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, nitroselüloz membranlar %0.05 Tween-20 içeren

tamponda 1:1000 seyreltilmiş, peroksidaz ile konjuge edilmiş goat anti-rabbit immüoglobulini ile 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Son aşamada ise nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika sürecek şekilde tampon solüsyonuyla yıkandı. Normalizasyon için beta-aktin kullanıldı.

Bantların görüntülenmesi: 1 M konsantrasyonunda pH'ı 7.4 olan Tris pH: 7.4 tamponunda %0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu bantların görüntülenmesi amacı ile kullanıldı. DAB'la gerçekleşen reaksiyon tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa süre sonra belirgin hale geldi. Yaklaşık 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresinin ardında DAB'la renklendirilen bantlar net bir şekilde görünür hale geldikten sonra nitroselüloz membranlar iyi bir şekilde yıkandı. Yeterince kurutulan nitroselüloz membranlar, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System yazılım programı aracılığıyla analiz edildi.

4.9. ELISA

TAK-1 ve ZBP-1 düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Deneysel gruplardan elde edilen kan örnekleri, pıhtılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri -80 °C'de analiz zamanına kadar saklandı. TAK1 ve ZBP1 proteinlerinin serum düzeyleri, BTLab (Shanghai Korain Biotech Co., Ltd., Çin) firmasından temin edilen ELISA kitleri kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde ölçüldü. Kullanılan kitler aşağıdaki katalog numaralarıyla temin edilmiştir (TAK1: Cat. No: E14351h, ZBP1: Cat. No: E14982h)

Kitle birlikte sağlanan stok standart solüsyon, seri dilüsyonlarla farklı konsantrasyonlara seyreltilerek standart eğriler oluşturuldu. Kuyucuklara önceden planlanan sıraya göre 50 µL standart veya 40 µL serum örneği eklendi. Örnekler ve standartlar, plakadaki ön kaplanmış antikorlarla bağlanmaları için 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bağlanmayan maddeleri uzaklaştırmak için plakalar 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 10 µL biotinle işaretli sekonder antikor eklendi ve 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Plakalar tekrar yıkandıktan sonra her kuyucuğa 50 µL HRP-konjuge streptavidin eklendi, 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µL TMB substratı eklendi. Renk değişimi için karanlık ortamda 15–20 dakika boyunca beklendi. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Son olarak mikroyuvarlak mikroyuvarlak okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart eğri kullanılarak serum örneklerinin TAK1 ve ZBP1 konsantrasyonları hesaplandı. Tüm örnekler duplike olarak çalışıldı. Ölçümlerin doğruluğunu sağlamak adına boş, negatif kontrol ve pozitif kontrol kuyucukları da deney tasarımına dahil edildi (Walker ve Crowther, 2009).

4.10. İstatistik

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 programı kullanılarak değerlendirildi, sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde raporlandı. Normallik Shapiro–Wilk testi ile gruplar arası farklar tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile analiz edilmiştir. Korelasyon analizinde Pearson testi ve iki yönlü anlamlılık değerlendirmesi kullanılmış, $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

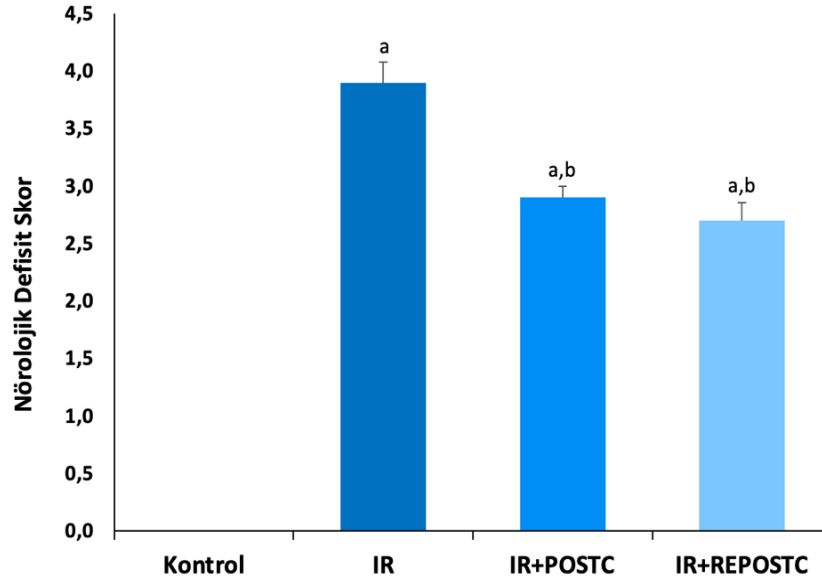
5.1. Nörolojik Bulgu Skorlaması

Serebral I/R modeli oluşturulan gruplarda PostC ve RePostC tedavilerinin NDS üzerine etkisi Şekil 18’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, Nörolojik bulguların skor ortalaması IR grubunda 3.90 ± 0.17 düzeyindeydi. Bu skorun IR grubuna göre IR+PostC (2.90 ± 0.10) ve IR+RePostC (2.70 ± 0.15) uygulanan tedavi gruplarında anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Grupların nörolojik defisit skorları Tablo 3’te, nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi Şekil 20’de verilmiştir.

Tablo 3. Grupların hesaplanan nörolojik defisit skorları

Grup	Nörolojik Defisit Skor
Kontrol	0
IR	3.90 ± 0.17^a
IR+PostC	$2.90 \pm 0.10^{a,b}$
IR+RePostC	$2.70 \pm 0.15^{a,b}$

Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi. (Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 20. Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi.

(Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$).

5.2. Davranış Testleri

Deneysel serebral iskemi sonrası nörolojik ve motor fonksiyonların değerlendirilmesi amacıyla; açık alan testi, dikey çubuk testi ve kiriş yürüme testi uygulandı.

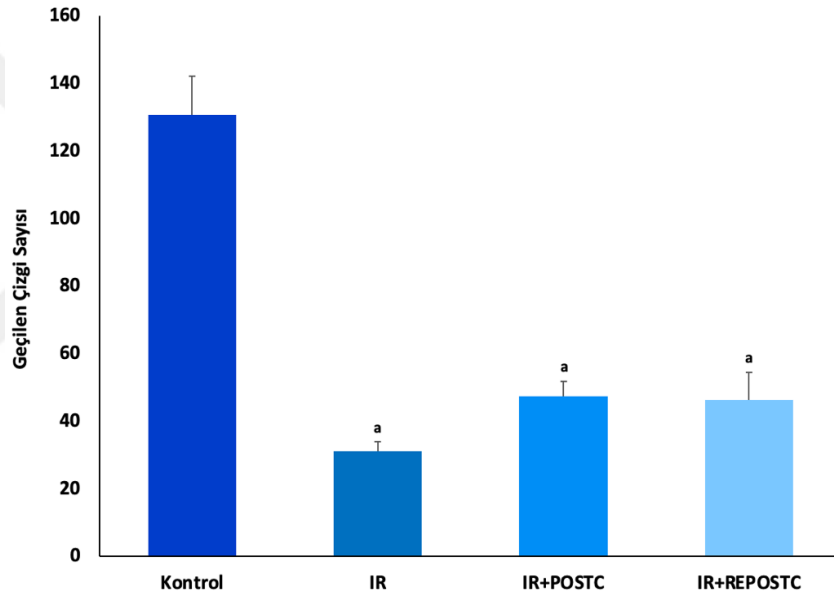
5.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testinde geçilen çizgi sayısının grup bazlı dağılımı Şekil 21’de gösterilmiştir. Sıçanların geçtikleri çizgi sayısı IR grubu (31.13 ± 2.81)’nda kontrol (130.63 ± 11.63)’e göre anlamlı düzeyde azaldı. Ancak IR+PostC (47.46 ± 4.42) ve IR+RePostC (46.33 ± 8.20) gruplarında IR grubuna göre anlamlı bir değişme gözlenmedi ($p < 0.05$).

Tablo 4. Gruplara göre açık alan testinde geçilen çizgi sayısı

Grup	Geçilen Çizgi Sayısı
Kontrol	130.63 ± 11.63
IR	31.13 ± 2.81 ^a
IR+PostC	47.46 ± 4.42 ^a
IR+RePostC	46.33 ± 8.20 ^a

Gruplara göre açık alan testinde geçilen çizgi sayısı (Veriler ortalama ± SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a, b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p<0.05$).



Şekil 21. Gruplara göre açık alan testinde geçilen çizgi sayısı

(Veriler ortalama ± SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a, b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p<0.05$).

5.2.2. Dikey Çubuk Testi

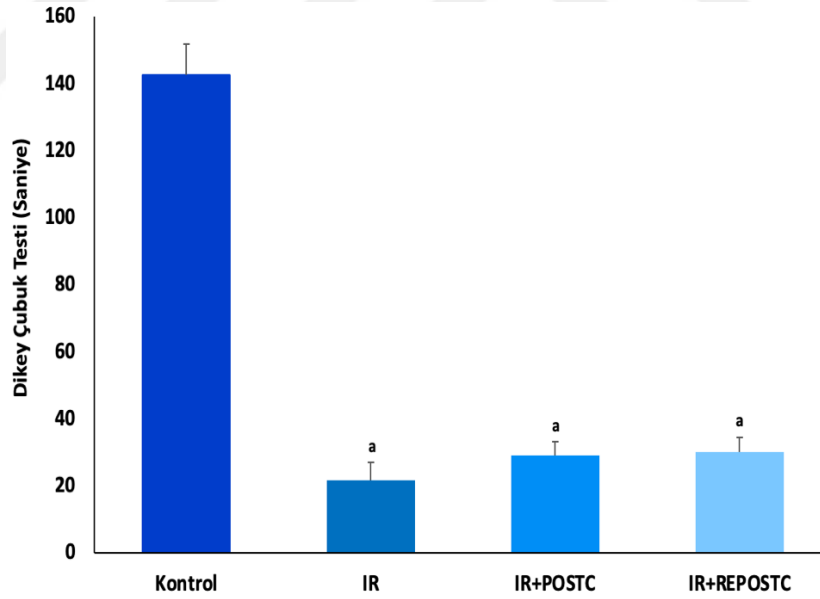
Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi Şekil 22’de verilmiştir. Sıçanların dikey çubukta kalma süreleri değerlendirildiğinde IR grubu (21.71 ± 5.41 sn)’nda kontrol (142.61 ± 9.10 sn)’e göre anlamlı azaldı. PostC (29.12 ± 4.12 sn)

ve RePostC (30.26 ± 4.21 sn) ile tedavi edilen gruplarda ise IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişmeye rastlanmadı ($p < 0.05$).

Tablo 5. Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi

Grup	Dikey Çubukta Kalma Süresi
Kontrol	142.61 ± 9.10
IR	21.71 ± 5.41^a
IR+PostC	29.12 ± 4.12^a
IR+RePostC	30.26 ± 4.21^a

Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi. (Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 22. Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi

(Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$).

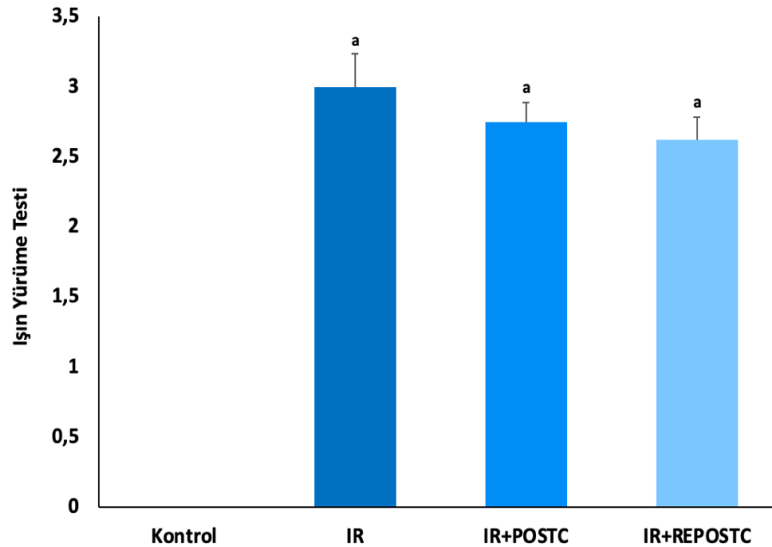
5.2.3. Kiriş yürüme testi

Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi Şekil 23'te verilmiştir. Kiriş yürüme testi skor ortalaması IR (2.99 ± 0.23) uygulaması ile anlamlı arttı. IR+PostC (2.74 ± 0.14) ve IR+RePostC (2.62 ± 0.16) gruplarında IR grubuna göre anlamlı bir değişme gözlenmedi ($p < 0.05$).

Tablo 6. Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi

Grup	Kiriş Yürüme Testi Skoru
Kontrol	0
IR	2.99 ± 0.23^a
IR+PostC	2.74 ± 0.14^a
IR+RePostC	2.62 ± 0.16^a

Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi (Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$)).



Şekil 23. Kiriş yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi

(Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$)).

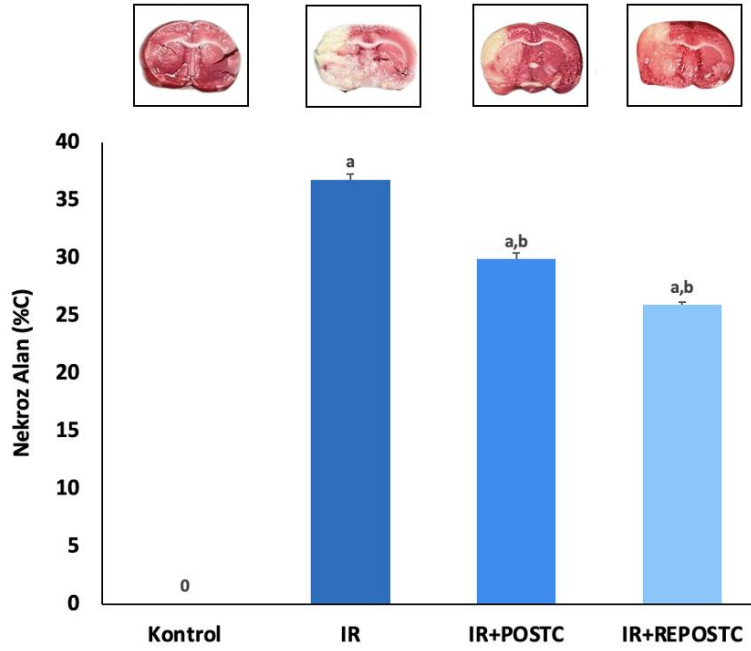
5.3. Nekroz Alanı Ölçüm Bulguları

PostC ve RePostC'nin IR'a bağlı nekroz alan yüzdesine etkisi Şekil 24'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda IR modeli oluşturulmadığı için bu grupta nekroz alan gözlenmedi. PostC (29.91 ± 0.50) ve RePostC (25.94 ± 0.26) uygulanan gruplarda IR (36.77 ± 0.49) grubuna göre nekroz alan yüzdesinin düşük olduğu ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Tedavi grupları arasındaki değişiklikler karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p < 0.05$).

Tablo 7. Grupların hesaplanan nekroz alanları.

Grup	Nekroz Alanı(%C)
Kontrol	0
IR	36.77 ± 0.49^a
IR+PostC	$29.91 \pm 0.50^{a,b}$
IR+RePostC	$25.94 \pm 0.26^{a,b}$

Nekroz alanın (%C) gruplara göre değişimi Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi (Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$)).



Şekil 24. Nekroz alanın (%C) gruplara göre değişimi Nörolojik defisit skorun gruplara göre değişimi

(Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Farklı harfler (*a*, *b*) gruplar arasında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$)).

5.4. Western Blot Bulguları

Apaf-1, RIPK3, Gasdermin D, ACSL4 ve Sestrin2 düzeyleri Western blot ile belirlendi.

5.4.1 Apaf-1 protein ekspresyon düzeyleri

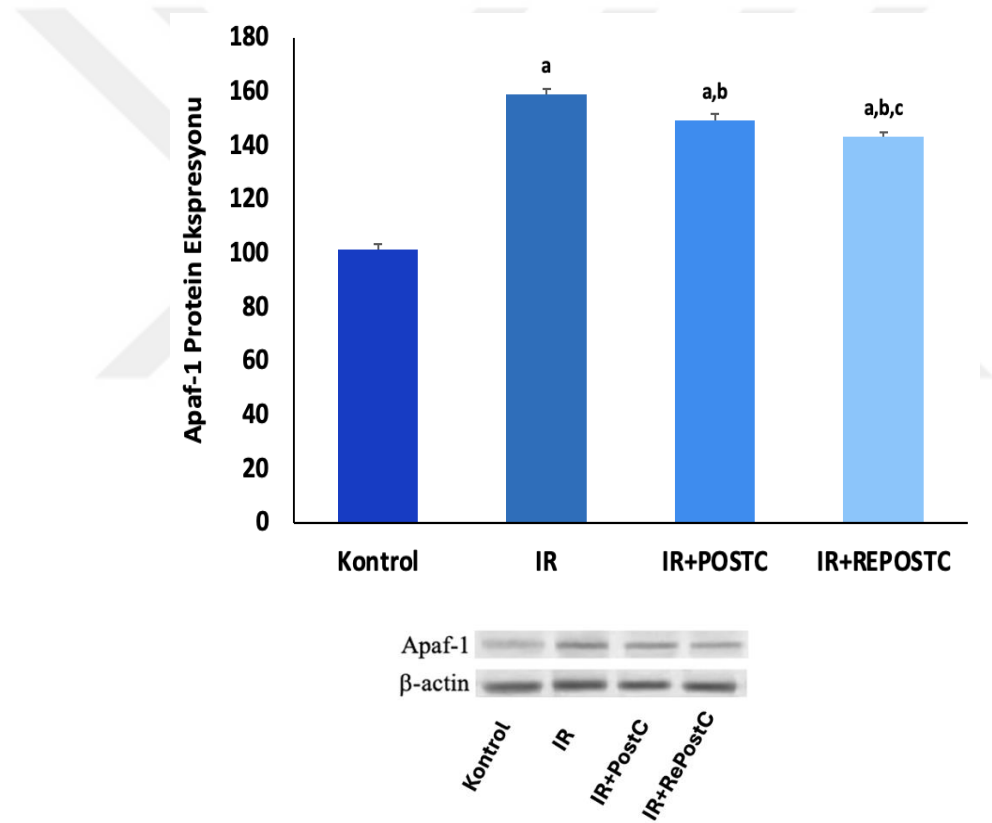
Apaf-1 protein ekspresyon düzeyleri IR grubu (159.20 ± 1.99)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı, IR+PostC (149.60 ± 2.26) ve IR+RePostC (143.30 ± 1.69) gruplarında ise IR grubuna göre anlamlı azaldı. Tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Grupların

değişen Apaf-1 düzeyleri Tablo 8’de, Apaf-1 düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 25’te verilmiştir.

Tablo 8. Grupların Apaf-1 düzeyi üzerine etkileri

Grup	Apaf-1 Düzeyi
Kontrol	101.40 ± 2.16
IR	159.20 ± 1.99 ^a
IR+PostC	149.60 ± 2.26 ^{a,b}
IR+RePostC	143.30 ± 1.69 ^{a,b,c}

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p<0.05$).



Şekil 25. Grupların Apaf-1 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri

Western blot analizlerinde protein yükleme kontrolü için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p<0.05$).

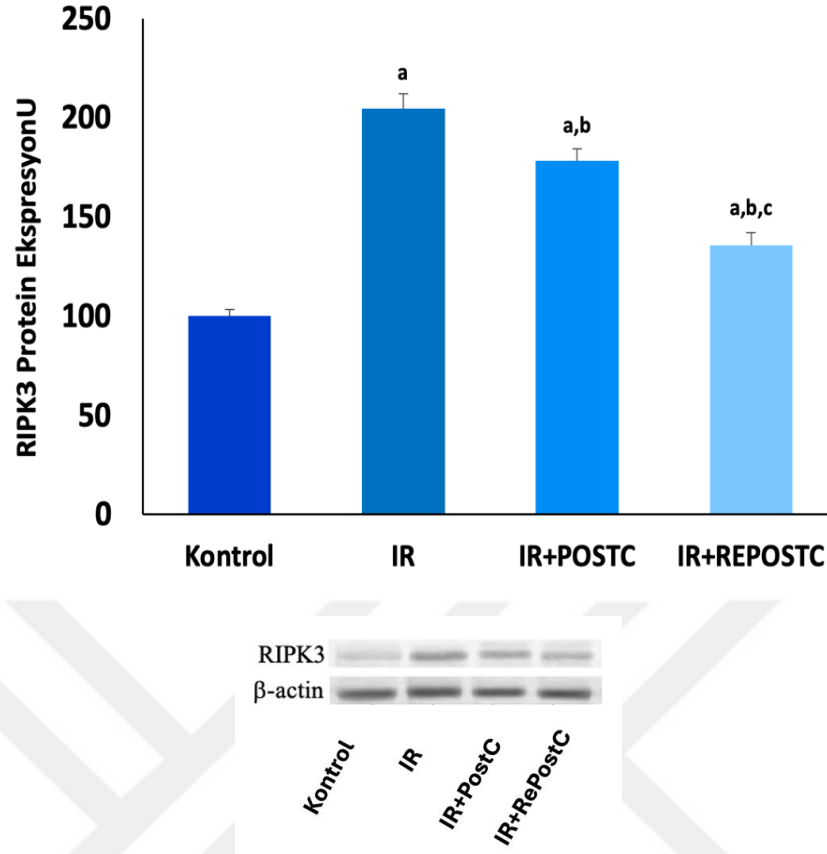
5.4.2. RIPK3 protein ekspresyon düzeyleri

RIPK3 protein ekspresyon düzeyleri IR grubu (204.7 ± 7.27)'nda kontrol grubuna (100.0 ± 3.34) göre anlamlı olarak arttı; IR+PostC (178.4 ± 5.86) ve IR+RePostC (135.7 ± 6.30) gruplarında ise RIPK3 düzeyleri IR 'ye göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre anlamlı bulundu. Grupların değişen RIPK3 düzeyleri Tablo 9'da, RIPK3 düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 26'da verilmiştir.

Tablo 9. Grupların RIPK3 düzeyi üzerine etkileri

Grup	RIPK3 Düzeyi
Kontrol	100.0 ± 3.34
IR	204.7 ± 7.27^a
IR+PostC	$178.4 \pm 5.86^{a,b}$
IR+RePostC	$135.7 \pm 6.30^{a,b,c}$

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).



Şekil 26. Grupların RIPK3 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.

Western blot analizlerinde protein yüklemesi için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).

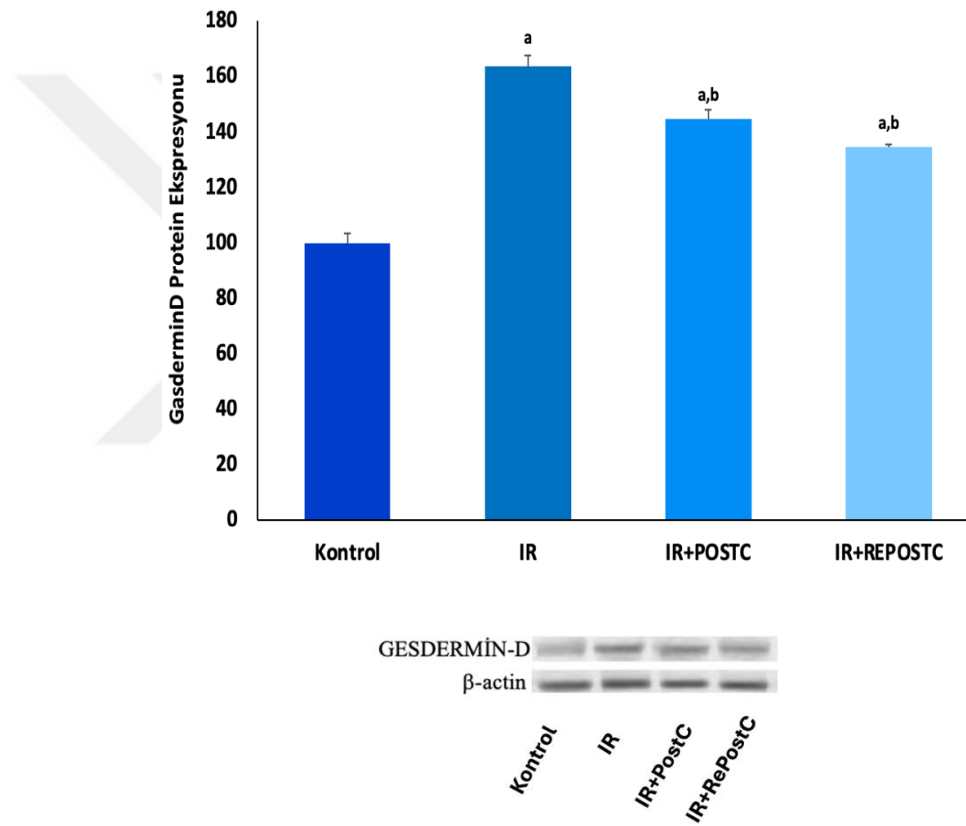
5.4.3. Gasdermin D protein ekspresyon düzeyleri

Gasdermin D protein ekspresyon düzeyleri IR grubu (163.8 ± 3.74)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IR+PostC (144.6 ± 3.23) ve IR+RePostC (134.4 ± 1.06) gruplarında ise Gasdermin D düzeyleri IR 'ye göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi grupları arasındaki değişiklikler karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Grupların değişen Gasdermin D düzeyleri Tablo 10'da, Gasdermin D düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 27'de verilmiştir.

Tablo 10. Grupların Gasdermin D düzeyi üzerine etkileri

Grup	Gasdermin D Düzeyi
Kontrol	100.0 ± 3.34
IR	163.8 ± 3.74 ^a
IR+PostC	144.6 ± 3.23 ^{a,b}
IR+RePostC	134.4 ± 1.06 ^{a,b}

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).



Şekil 27. Grupların Gasdermin D düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.

Western blot analizlerinde protein yüklemesi için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).

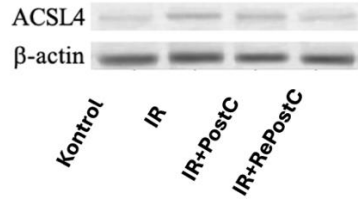
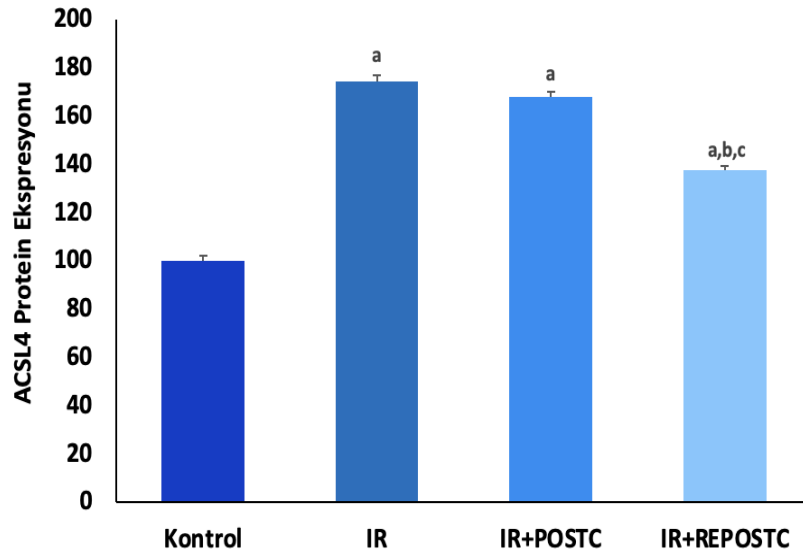
5.4.4. ACSL4 protein ekspresyon düzeyleri

ACSL4 protein ekspresyon düzeyleri IR (174.3 ± 2.45) grubunda kontrol (100.0 ± 2.05) grubuna göre anlamlı arttı. IR+PostC (168.1 ± 2.21) ve IR+RePostC (137.7 ± 1.50) gruplarında ise IR grubuna göre azaldı. Tedavi gruplarından IR+PostC'deki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken IR+RepostC grubundaki azalma Kontrol, IR ve IR+PostC gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Grupların değişen ACSL4 düzeyleri Tablo 11'de, ACSL4 düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 28'de verilmiştir.

Tablo 11. Grupların ACSL4 düzeyi üzerine etkileri

Grup	ACSL4 Düzeyi
Kontrol	100.0 ± 2.05
IR	174.3 ± 2.45^a
IR+PostC	168.1 ± 2.21^a
IR+RePostC	$137.7 \pm 1.50^{a,b,c}$

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).



Şekil 28. Grupların ACSL4 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.

Western blot analizlerinde protein yükleme kontrolü için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).

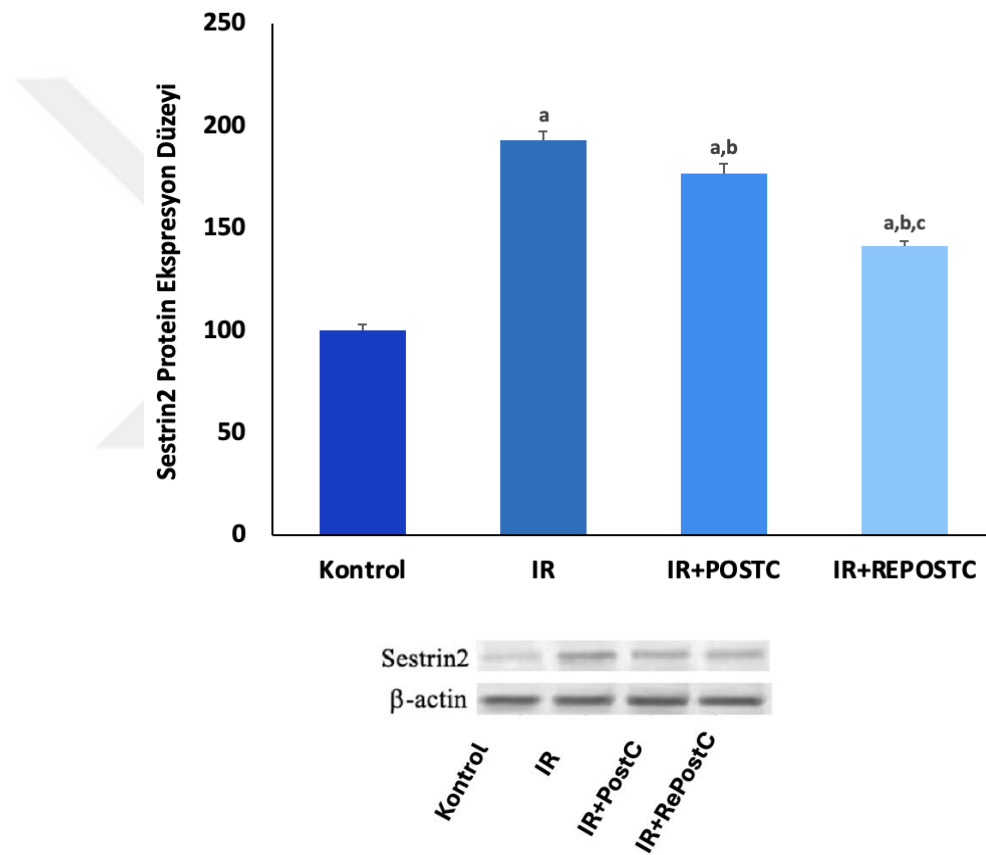
5.4.5. Sestrin 2 protein ekspresyon düzeyleri

Sestrin2 protein ekspresyon düzeyleri IR grubu (193.1 ± 4.16)'nda kontrol grubuna (100.0 ± 2.84) göre anlamlı olarak arttı; IR+PostC (176.9 ± 4.68) ve IR+RePostC (141.1 ± 2.41) gruplarında ise Sestrin 2 düzeyleri IR 'ye göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre anlamlı bulundu. Grupların değişen Sestrin2 düzeyleri Tablo 12'de, Sestrin2 düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 29'da verilmiştir.

Tablo 12. Grupların Sestrin 2 düzeyi üzerine etkileri

Grup	Sestrin 2 Düzeyi
Kontrol	100.0 ± 2.84
IR	193.1 ± 4.16 ^a
IR+PostC	176.9 ± 4.68 ^{a,b}
IR+RePostC	141.1 ± 2.41 ^{a,b,c}

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).



Şekil 29. Grupların Sestrin2 düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.

Western blot analizlerinde protein yükleme kontrolü için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).

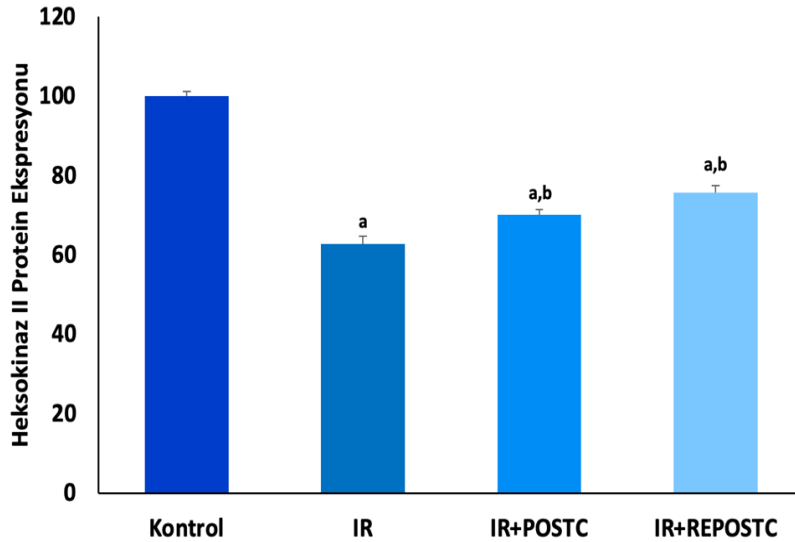
5.4.6. Heksokinaz II protein ekspresyon düzeyleri

Heksokinaz II protein ekspresyon düzeyleri IR grubu (62.82 ± 1.92)'nda kontrol grubuna (100.0 ± 1.13) göre anlamlı arttı. IR+PostC (70.13 ± 1.37) ve IR+RePostC (75.71 ± 1.79) gruplarında ise Heksokinaz II düzeyleri IR'ye göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi gruplarındaki değişimler birbirleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığa rastlanmadı. Grupların değişen Heksokinaz II düzeyleri Tablo 13'te, Heksokinaz II düzeylerinin grafiği ve Western blot bant görüntüleri Şekil 30'da verilmiştir.

Tablo 13. Grupların Heksokinaz II düzeyi üzerine etkileri

Grup	Heksokinaz II Düzeyi
Kontrol	100.0 ± 1.13
IR	62.82 ± 1.92^a
IR+PostC	$70.13 \pm 1.37^{a,b}$
IR+RePostC	$75.71 \pm 1.79^{a,b}$

Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).



Şekil 30. Grupların Heksokinaz II düzeyi üzerine etkisi ve Western blot bant görüntüleri.

Western blot analizlerinde protein yükleme kontrolü için aktin kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel değerlendirmede tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Anlamlılık: (a) kontrol, (b) IR, (c) PostC grubuna göre ($p < 0.05$).

5.5. ELISA Bulguları

ZBP1 ve TAK1 düzeyleri ELİSA metodu ile belirlendi.

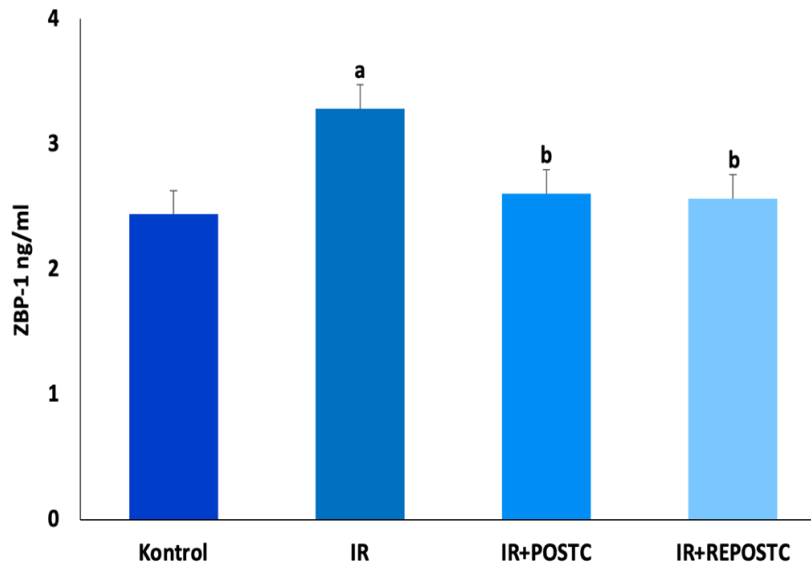
5.5.1. ZBP-1 düzeyleri

ZBP-1 protein düzeyleri IR grubu (3.28 ± 0.28)’nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IR+PostC (2.60 ± 0.11) ve IR+RePostC (2.56 ± 0.34) gruplarında ise ZBP-1 düzeyleri IR ‘ye göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi grupları arasındaki değişiklikler karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 14. Grupların ZBP-1 düzeyi üzerine etkileri

Grup	ZBP-1 Düzeyi
Kontrol	2.43 ± 0.11
IR	3.28 ± 0.28^a
IR+PostC	2.60 ± 0.11^b
IR+RePostC	2.56 ± 0.34^b

(a) Kontrole göre anlamlılık, (b) IR’ye göre anlamlılık ($p < 0.05$).



Şekil 31. Grupların ZBP-1 düzeyi üzerine etkisi ((a) Kontrole göre anlamlılık, (b) IR’ye göre anlamlılık($p < 0.05$)).

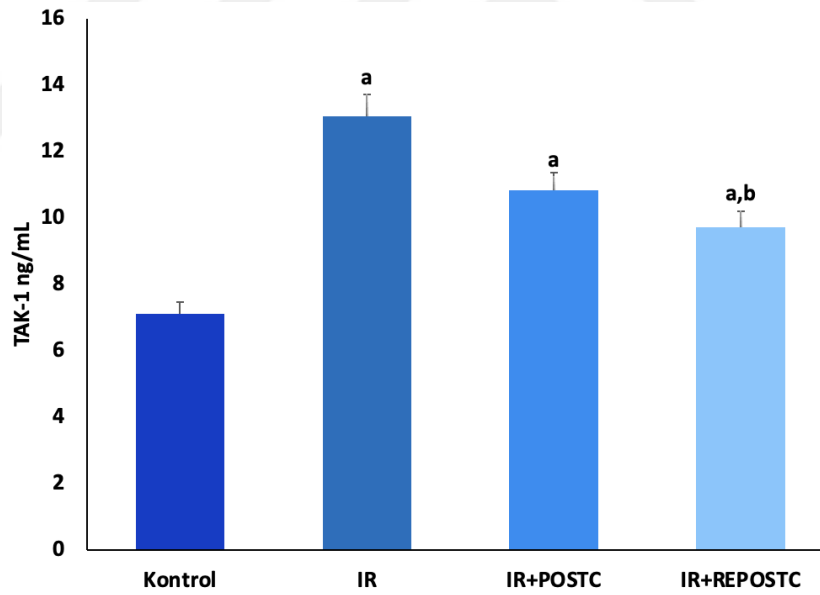
5.5.1. TAK-1 düzeyleri

TAK-1 protein düzeyleri IR grubu (13.07 ± 2.83)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IR+RePostC (9.71 ± 1.21) grubunda ise ZBP-1 düzeyleri IR ve IR+PostC (10.83 ± 2.05) gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. IR+PostC grubu ile IR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi.

Tablo 15. Grupların TAK-1 düzeyi üzerine etkileri

Grup	TAK-1 Düzeyi
Kontrol	7.10 ± 1.04
IR	13.07 ± 2.83^a
IR+PostC	10.83 ± 2.05^a
IR+RePostC	$9.71 \pm 1.21^{a,b}$

(a) Kontrole göre anlamlılık, (b) IR'ye göre anlamlılık ($p < 0.05$).



Şekil 32. Grupların TAK-1 düzeyi üzerine etkisi ((a) Kontrole göre anlamlılık, (b) IR'ye göre anlamlılık ($p < 0.05$)).

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda serebral I/R hasarında hücre ölüm yollarından apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptozun rolü, mekanik tedavi yöntemleri olarak PostC ile RePostC'nin koruyuculukları ve PostC ile RePostC'nin mitokondriyal Heksokinaz II, Sestrin2, TAK1 ve ZBP1 düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca tedavilerin I/R hasarı sonrası lökomotor aktivite üzerine etkilerini incelemek için açık alan, dikey çubuk ve giriş yürüme testleri uygulandı.

Davranış testlerinde sıçanların geçtikleri çizgi sayısı I/R hasarı ile azalırken, dikey çubukta kalma süreleri kısaldı, giriş yürüme testi ve nörolojik bulgu skor ortalamaları anlamlı olarak arttı. PostC ve RePostC olarak uygulanan tedaviler davranış testlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Serebral I/R ye bağlı nekroz alan ve nörolojik bulgu skoruda I/R grubuna göre PostC ve RePostC ile tedavi edilen sıçanlarda anlamlı olarak azaldı. Apaf-1 ve RIPK3 düzeyleri kontrol grubuna göre I/R grubunda anlamlı olarak arttı. PostC ve RePostC ile tedavi edilen gruplarda hem Apaf-1 hem RIPK3 düzeyleri I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi grupları arasındaki değişimler kıyaslandığında RePostC'deki azalma PostC'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. GsdmD düzeyleri kontrol grubuna göre I/R grubunda anlamlı olarak arttı. PostC ve RePostC ile tedavi edilen gruplardaysa I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. ACSL4 düzeyleri kontrol grubuna göre I/R grubunda anlamlı olarak arttı. RePostC uygulanan grupta I/R ve I/R+PostC grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Sesn2 düzeyleri kontrol grubuna göre I/R grubunda anlamlı olarak arttı, PostC ve RePostC tedavisi uygulanan gruplarda I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi grupları arasındaki değişimler kıyaslandığında RePostC'deki azalma PostC'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. HK-II düzeyleri kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak azaldı. PostC ve RePostC ile tedavi edilen grupta I/R grubuna göre anlamlı olarak arttı. ZBP1 düzeyleri

kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak arttı, tedavi gruplarında ise I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. TAK1 düzeyleri I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı, RePostC ile tedavi edilen grupta I/R ve I/R+PostC grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Çalışmamızda serebral I/R hasarında iskemik ardkoşullanma ve uzak iskemik ardkoşullanmanın Sesn2, Apaf-1, ZBP1 ve TAK1 düzeyleri üzerine etkileri ilk kez gösterildi.

İnme, dünyada mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir. "Serebral iskemi" olarak adlandırılan iskemik inme, tüm inme vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur. I/R hasarının moleküler sonuçlarını anlamak ve hafifletmek, beyin hasarını azaltmayı amaçlayan etkili terapötik stratejiler geliştirmek için önemlidir (Elsisi, 2025). Serebral iskemide intravenöz tromboliz ve endovasküler trombektomi yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleridir ancak terapötik aralıklarının dar olması, istenmeyen kanamalara neden olmaları gibi çeşitli dezavantajları vardır. Etkin nöroproteksiyon için beynin endojen koruyucu stratejilerini ortaya çıkarmak oldukça önemlidir (Arslan ve ark., 2024). RePostC hayati organlarda yaşamı tehdit eden iskemik bir olayın ardından vital olmayan organlarda kısa, ölümcül olmayan iskemik atakların indüklenmesi ile tedavinin sağlanması prensibine dayanır. Bu süreç, iskemik ve hasarlı beyin dokusunu koruyarak doğuştan gelen iskemik tolerans mekanizmalarını tetikler (M. Y. Yan ve ark., 2024).

PostC ve RePostC'nin vücuttaki hem nöronal proliferasyonu arttırıcı ve nöroinflamasyonu azaltıcı hem de serebral I/R nedenleri arasında yer alan metabolik parametreleri iyileştirici rolleri, serebral I/R hasarını hafifletebileceğini düşündürmektedir. Çok sayıda çalışma, PostC'nin iskemi reperfüzyon hasarında enflamatuar reaksiyonu bastırabileceğini, serebral dolaşımı iyileştirebileceğini, enfarktüs hacmini azaltabileceğini ve hem nörogenezi hem de anjiyogenezi destekleyebileceğini

göstermiştir (Z. Li ve ark., 2017). Araştırmalar, RePostC uygulamasının sıçanlarda serebral enfarktüs boyutunda yaklaşık %40'lık bir azalmaya yol açabileceğini göstermiştir (Q. Wu ve ark., 2024). Ornella ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada RePostC ile indüklenen kan kaynaklı eksozomların sistemik uygulaması, belirli bir miRNA kümesi sunarak, iskemik hasarı ve nörolojik işlevi iyileştirmiştir (Ornella ve ark., 2024). Çalışmamızda serebral I/R modeli oluşturduğumuz sıçanlara PostC ve RePostC tedavilerinin uygulanmasının infarkt alanını literatürle paralel şekilde azalttığını tespit ettik.

NDS, serebral I/R hasarına bağlı gelişen nörolojik fonksiyon bozukluklarını değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir metod olup, bu kapsamda Bederson skorlama yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Bederson skoru, deney hayvanlarında özellikle vücudun spontan olarak sağa dönme derecesini inceleyerek serebral I/R kaynaklı nörolojik yetersizliklerin şiddetini nicel olarak ortaya koyar (Cui ve ark., 2024). Çalışmamızda serebral I/R sonrası sıçanların nörolojik işlevini değerlendirmek amacıyla Bederson skoru kullanılmıştır. İskemi sonrası meydana gelen nekroz alanın ölçülmesi amacıyla TTC boyama metodu uygulanmıştır. Bu teknik dokudaki canlı ve nekroz bölgelerin ayrımı ile nekroz alanının tespiti esasına dayanıp serebral I/R'nin neden olduğu hasarın boyutunu göstermektedir (Chan ve ark., 2020). Böylece hem fonksiyonel hem de morfolojik düzeyde serebral I/R hasarının etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda serebral I/R modeli oluşturduğumuz sıçanlara PostC ve RePostC tedavilerinin uygulanmasının nörolojik bulguları iyileştirdiği gösterilmiştir.

Açık alan testi, kemirgenlerde hareketliliğin yanı sıra kaygı düzeyi, bakım ve keşif davranışlarını değerlendirmek amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hareket kabiliyetindeki değişiklikler, bozulmuş nörolojik süreçlerin göstergesi olabilir ve bu nedenle anormal beyin fonksiyonunu yansıtabilir. Sağlıklı olmayan hayvanların test

alanında hareket etme düzeylerinin genellikle azaldığı bilinmektedir (Ann-Katrin Kraeuter, 2019). Yakın zamanda Wang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada serebral I/R hasarı sıçanlarda lökomotor aktiviteye ciddi hasar verirken Saikasaponin A uygulamasından sonra 17. günden itibaren sıçanların lökomotor aktivite skorunun önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir Rong Wang ve ark., 2021). Başka bir çalışmada I/R hasarı sonrası sıçanların geçtiği çizgi sayısı azalırken Naruritin ile tedavi edilen grupta I/R grubuna kıyasla önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Patel ve ark., 2022). Çalışmamızda, açık alan testinde I/R ile sıçanların geçtiği çizgi sayısı azalırken, tedaviler ile anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bu etki, reperfüzyon süresinin 24 saatle sınırlı olmasından kaynaklanabilir.

Motor koordinasyonu değerlendirmek için kullanılan testlerden bir diğeri de dikey çubuk testidir. Bilateral ortak karotid arter tıkanıklığı ile serebral I/R modeli oluşturulan sıçanlarda dikey kutupta kalış süresinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Nikotinamid ve ön koşullanma tedavilerinin uygulanması, nöroprotektif etki göstererek dikey çubukta kalma sürelerini anlamlı olarak uzatmıştır (Arslan ve ark., 2024). Çalışmamızda ise sıçanların dikey çubuk üzerinde geçirdiği süre iskemik hasar ile anlamlı azalırken, tedavi metodları anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bu durumun nedeni reperfüzyon süresinin kısa olması ile ilişkili olabilir.

Kiriş yürüme testi, lökomotor ve sensörimotor aktiviteyi değerlendirmek için kullanılır. Tekrarlanan ayak parmaklarının fleksiyonu ve ekstansiyonu oldukça bu test için önemlidir (D. H. Lee ve ark., 2020). Çalışmamızda da I/R hasarı ile giriş yürüme testlerinde yüksek skorla karşılaşıldı ve tedavi metotları bu skorlar üzerinde anlamlı bir etki oluşturamadı.

Genel olarak uygulanan tedaviler davranış testlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bu durum moleküler düzeyde bazı hücre ölüm mekanizmalarının

baskılandığını, biyokimyasal bir yanıt oluştuğunu, ancak bunun davranışsal düzeyde henüz fonksiyonel iyileşmeye yansımadağını gösterebilir. Davranış testlerinde uygulanan tedavilerin anlamlı değişikliğe neden olmaması zamanlama farkından kaynaklanabilir (Ludwig ve ark., 2007). Protein düzeyleri erken dönem yanıtı yansıtırken, davranışsal değişiklikler daha geç ortaya çıkabilir. Kritik eşik aşılmadağı için protein düzeyinde gözlenen azalma davranışsal değişim oluşturmak için yeterli düzeyde olmayabilir. Davranış, sadece bir ya da iki molekülün değişimiyle değil, çoklu sistemlerin birlikte değişmesiyle etkilenir (Ramagiri ve Taliyan, 2017). Bu nedenle davranışsal düzeyde değişiklik gözlemlenmese bile, moleküler düzeyde gerçekleşen değişiklikler koruyucu bir etkinin başladığını, ancak henüz davranışsal olarak anlamlı sonuç vermediğini düşündürebilir.

Serebral I/R hasarında apoptoz, iskemik olayın başlangıcından birkaç gün sonra hatta birkaç haftaya kadar devam edebilir. Kaspazlar serebral I/R hasarında apoptoz ve nörodejenerasyonda kritik rol oynar. Sıçan beyinde, çeşitli apoptotik proteinlerin düzeylerinin inme sonrası ilk saatlerde penumbra arttığı gösterilmiştir. Sıçan serebral korteksinde OSA oklüzyonundan 0.5-1 saat sonra enfarktüs çekirdeğinde kaspaz 1, 3, 6, 8 ve 9' un aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Bu etkinin iskeminin 12-24 saat sonrasında arttığı belirtilmiştir (He ve ark., 2020). Sitokrom c, iskemik çekirdekteki nöronal sitoplazmada ve sıçan beyinde OSA oklüzyonundan 3 saat sonra penumbra ortaya çıkmıştır. Diğer mitokondriyal proapoptotik proteinlerden AIF'ın OSA oklüzyonundan 4-12 saat sonra penumbra aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Althaus ve ark., 2007). Sıçan serebral korteksinde AIF ve XAF1'in (apoptoz inhibitörü XIAP'ın antagonisti) aşırı ekspresyonu daha sonra, OSA oklüzyonundan 6-24 saat sonra gözlenmiştir. Bu etkiler, bu pro-apoptotik proteinlerin sitozole geçtiği dış mitokondriyal zarda megaporu oluşturan BID ve Bax'ın aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir

(Uzdensky, 2019). Geri dönüşü olmayan ve önlenemeyen programlanmamış hücre ölümünün aksine, apoptoz yüksek oranda düzenlenebilir ve prensipte farklı farmakolojik ajanlar tarafından baskılanabilir. Bu nedenle, penumbradaki beyin dokusu potansiyel olarak kurtarılabilir. Apoptozun baskılanması, inme tedavisinde nöroprotektif stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir (Fricker ve ark., 2018). Li ve ark. RePostC'nin p38MAPK yolağı aracılığıyla apoptozu inhibe ederek serebral I/R hasarını azaltabileceğini göstermiştir (Li ve ark., 2015). Bu bilgiler doğrultusunda literatürde PostC ve RePostC'nin pro-apoptotik; Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 ekspresyonunu azaltarak anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu artırarak apoptozu baskıladığı çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ancak Apaf-1 molekülü üzerine Postc veya RePostC'nin etkilerini araştıran bir çalışma henüz bulunmuyor. Çalışmamızda Apaf-1 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulanması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Ayrıca tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu da PostC ve RePostC'nin apoptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Nekroptoz, serebral iskemi ve IR hasarını takiben çeşitli hücre ölümü biçimlerinden biri olarak gözlenmiştir ve organellerin şişmesi, membran rüptürü gibi morfolojik RIPK1, RIPK3, MLKL aktivasyonu moleküler değişikliklerle karakterize edilmiştir (Liao ve ark., 2020). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada nekroptotik proteinlerdeki değişiklikler, reperfüzyondan sonra çeşitli zaman noktalarında 1-2 saat boyunca orta serebral arter tıkanıklığı tarafından indüklenen bir fokal serebral I/R hasarı modelinde araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, 1 saatlik reperfüzyondan sonra RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin anlamlı olarak arttığını göstermiştir (M. G. Naito ve ark., 2020). Başka bir çalışma da serebral I/R modelinde RIPK1 ve RIPK3'ün maksimum

ekspresyonları 72 saat reperfüzyondan sonra bulunurken, MLKL ekspresyonu 12, 24 ve 72 saat reperfüzyondan sonra maksimum miktarda ölçülmüştür. Nekroptoz başlangıçta prefrontal kortekste bundan önce gelen hipokampüste tespit edilmiştir (Shakeri ve ark., 2021). Bu bulgular serebral I/R hasarı modelinde nekroptozun reperfüzyondan sonra meydana geldiğini ve birincil hedefinin nöronlar ve hipokampus olduğunu, nekroptozun enfarktüs hacmi ve nörolojik eksikliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda RIPK3 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulanması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Ayrıca tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu da PostC ve RePostC'nin nekroptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Fokal serebral iskemi/reperfüzyonun kemirgen modellerini kullanan birçok çalışma, NLRP1, NLRP3, AIM2 ve NLRC4 inflammasomlarının ve kaspaz-1 aktivasyonunun iskemik serebral dokularda meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca, nöronlarda, mikroglialarda, astrositlerde, vasküler endotel hücrelerinde ve periferik kandan infiltre edilmiş beyaz kan hücrelerinde NLRP1 veya NLRP3 inflammasome veya kaspaz-1 ekspresyonunda bir artış bildirilmiştir (Barrington ve ark., 2017). Ayrıca, farelerde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, iskemik kortikal nöronlarda Kaspaz 11'in aktive olduğunu göstermiştir (Yang-Wei Fann ve ark., 2013). Bu çalışmalar, piroptozun serebral iskemiden sonra meydana geldiğini ve doku hasarını şiddetlendirdiğini göstermektedir. Çalışmamızda Gasdermin D düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulaması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu da PostC ve RePostC'nin piroptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Şiddetli iskemik ve hipoksik beyin hasarından sonra bazal gangliyon, talamus, periventriküler ve subkortikal beyaz madde alanlarında demir birikimi artar. Çalışmalar, bir fare iskemik inme modelinde, nöronlardaki GSH seviyesinin önemli ölçüde azaldığını, lipid peroksidasyon derecesinin arttığını ve GPX'in aktivitesinin azaldığını göstermiştir. Ayrıca, ferroptoz inhibitörlerinin kullanımı iskemik inmeli hastaların prognozunu önemli ölçüde iyileştirir (Ahmad ve ark., 2014). Yu Cui ve Yan Zhang tarafından yapılan bir çalışmada fare ACSL4 geni cDNA'sını bir lentiviral vektöre klonlayarak, tOSA oklüzyonundan sonra sol beyne enjekte edilen kortikal lentivirüs uygulamasının, ACSL4 aşırı eksprese eden beyinde enfarkt boyutunun artmasına ve nörolojik fonksiyonun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada ACSL4'ün yıkılmasının iskemik beyin hasarını hafiflettiği bildirilmiştir (Cui ve ark., 2021). Çalışmamızda ACSL4 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulaması ile IR grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Tedavi gruplarından IR+RePostC grubundaki değişim IR+PostC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu da RePostC'nin ferroptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Sesn2'nin iskemik inme sonrası nöroproteksiyon, nöroinflamasyon baskılanması ve kan beyin bariyerinin korunması ile ilişkili potansiyel endojen koruyucu moleküllerden biri olduğuna inanılmaktadır (Shi ve ark., 2016). Sestrinler, AMPK-mTORC1 aksının aktivasyonu, hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılması için kritik olan otofajiyi indükleyebilir, ROS'un aşırı üretimini önleyerek redoks homeostazına katkıda bulunur ve böylece antioksidan, antiinflamatuvar etki gösterir (Lee J. H. ve ark., 2010). Sesn2'nin kalıcı serebral arter tıkanıklığına maruz kalan sıçan beyinlerinde aşırı ifade edildiği, iskemiye mağruz kalmamış sıçan beyinlerinde tespit edilemediği bildirilmiştir (B. Zhao ve ark., 2014). Ek olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışma, Sesn2'nin, JNK veya p38 aracılı c-Jun fosforilasyon yoluyla Toll benzeri reseptörü inhibe

ederek makrofajlarda pro-inflamatuar sinyalleme düzenlenmesinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir. Sestrinlerin, Toll benzeri reseptörlerle etkileşime girerek inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda Sesn2 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulaması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu da PostC ve RePostC'nin inflamasyonu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

HK-II, glikozu glikoz-6-fosfata dönüştüren glikoliz reaksiyonunun ilk basamağını katalize eden bir enzimdir. HK-II'nin mitokondriyal dış zar üzerindeki lokalizasyonu, hücresel enerji homeostazı ve apoptozun düzenlenmesi açısından kritik önem taşır (Hu ve ark., 2022). Serebral I/R hasarında, hücresel enerji kaybı, ROS aşırı artışı ve mitokondriyal disfonksiyon temel patofizyolojik olaylardır. HK-II'nin mitokondriye bağlanması, mPTP açılmasını engelleyerek apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir etki gösterir (Majewski ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda HK-II ekspresyonunun artırılmasının serebral iskemi modelinde nöroprotektif etki gösterdiği, oksidatif stresi azalttığı ve mitokondriyal stabiliteyi koruduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, HK-II'nin mitokondriden ayrılması ya da inhibitörlerle aktivitesinin azaltılması, I/R sonrası serebral hasarı ve inflamasyonu artırmaktadır (B. Wu ve ark., 2017). Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada, hiperglikolizi HK-II'ye bağlı bir şekilde nöroinflamasyon ile ilişkilendirmiş ve HK-II indüksiyonunu seçici olarak inhibe etmenin iskemik inme için yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini öne sürmüştür (Li Y. ve ark., 2018). Çalışmamızda mitokondriyal HK-II düzeyleri I/R hasarı ile birlikte azaldı. Bu durum, literatürde HK-II'nin mitokondriyal membran bütünlüğünü koruyucu rolüne ve enerji metabolizmasındaki merkezi konumuna paralel olarak, I/R hasarına bağlı mitokondriyal disfonksiyon ve hücre ölüm süreçlerinin aktifleştiğini desteklemektedir. PostC ve RePostC ile tedavi edilen gruplarda ise HK-II düzeyleri I/R grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Bu bulgulara

göre PostC ve RePostC uygulamaları HK-II ekspresyonunu arttırarak nöroprotektif etki gösterebilir. HK-II' nin mitokondriyal membrana bağlanma kapasitesini etkileyen mekanizmalar, apoptoz, nekroptoz ve piroptoz gibi düzenlenmiş hücre ölüm yollarını da dolaylı olarak etkileyebilir.

TAK1, TNF, IL-1 ve TLR sinyal yollarının düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Yapılan bir çalışmada TAK1'in travmatik beyin hasarı (TBI) oluştuktan sonra aktive edildiği ve inhibisyonunun inflamasyon ve apoptoz dahil olmak üzere TBI ile ilişkili biyokimyasal ve moleküler süreçleri azalttığını gösterilmiştir (S. Hao ve ark., 2024). Farklı bir çalışmada ise TAK1'in kısa süreli inhibisyonunun *in vitro* oksijen glikoz yoksunluğuna (OGD) karşı koruduğunu ve *in vivo* orta OSA oklüzyonundan sonra enfarktüs hacmini azalttığı bildirilmiştir (Neubert ve ark., 2011). Çalışmamızda TAK1 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulaması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu durum PostC ve RePostC'nin PANoptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

ZBP1, PANoptozom kompleksini bir araya getiren, PANoptozun ana düzenleyicisi olarak hücre ölüm yollarıyla ilişkili bir proteindir. Çevresel stres koşullarına yanıt olarak hücre ölüm türlerinden apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve enflamatuar yolların kesiştiği noktada hasar sürecine aracılık eder (Hao Y. ve ark., 2022). Çalışmamızda ZBP-1 düzeyleri I/R hasarı ile birlikte artarken PostC ve RePostC tedavilerinin uygulaması ile I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu bulgular PostC ve RePostC'nin PANoptozu baskılayarak serebral I/R hasarında koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Serebral I/R hasarında,

- Apaf-1 düzeylerinin artması patofizyolojide apoptozun rolünün olabileceğini,
- RIPK3 düzeylerinin artması patofizyolojide nekroptozun rolünün olabileceğini,

- GasderminD düzeylerinin artması patofizyolojide piroptozun rolünün olabileceğini,
- Acsl-4 düzeylerinin artması patofizyolojide ferroptozun rolünün olabileceğini,
- Sestrin 2 düzeyinin artması inflamasyonun serebral I/R'de hasar sürecine katkıda bulunduğunu ve Sesn2'nin endojen koruyucu mekanizmada görev aldığını,
- Mitokondriyal HK-II düzeylerinin azalması hasarda mitokondriyal disfonksiyonun etkili olabileceğini,
- ZBP-1 ve TAK-1 düzeylerinin artması PANoptozun serebral I/R'de hasar sürecine katkıda bulunduğunu

Serebral I/R hasarında PostC'nin,

- Nekroz alanı azaltarak ve nörolojik bulguları iyileştirerek koruyucu olabileceğini,
- Apaf-1 düzeyini azaltarak koruyuculukta apoptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- RIPK3 düzeyini azaltarak koruyuculukta nekroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- GasderminD düzeyini azaltarak koruyuculukta piroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- ACSL4 düzeyini azaltarak koruyuculukta ferroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- Sestrin2 düzeyini azaltarak koruyuculukta antienflamatuvar mekanizmaların rol alabileceğini,
- Mitokondriyal HKII düzeyini arttırması nin mitokondriyal membrana bağlanma kapasitesini etkileyen mekanizmaların rol alabileceğini,
- ZBP-1 ve TAK-1 düzeyini azaltarak koruyuculukta PANoptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,

Serebral I/R hasarında RePostC'nin,

- Nekroz alanı azaltarak ve nörolojik bulguları iyileştirerek koruyucu olabileceğini,
- Apaf-1 düzeyini azaltması koruyuculukta apoptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- RIPK3 düzeyini azaltması koruyuculukta nekroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- GasderminD düzeyini azaltması koruyuculukta piroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- ACSL4 düzeyini azaltması koruyuculukta ferroptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,
- Sestrin2 düzeyini azaltması koruyuculukta antienflamatuvar mekanizmaların rol alabileceğini,
- Mitokondriyal HK II düzeyini arttırması koruyuculukta mitokondriyal membrana bağlanma kapasitesini etkileyen mekanizmaların rol alabileceğini,
- ZBP-1 ve TAK-1 düzeyini azaltarak koruyuculukta PANoptoz inhibisyonunun rol alabileceğini,

PostC ve RePostC kıyaslandığında,

- ACSL4 ve TAK1 düzeylerindeki azalma I/R grubuna kıyasla sadece RePostC grubunda anlamlı bulundu
- Apaf-1, RIPK3 ve Sesn2 düzeylerindeki azalma PostC grubuna kıyasla RePostC grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu

RePostC, invaziv cerrahi girişim gerektirmeden periferik bir doku veya organa kolaylıkla uygulanabilen, zaman esnekliği sunan ve moleküler düzeyde belirgin koruyucu etkiler gösteren bir tedavi yöntemi olarak klinik uygulamalarda daha sık tercih edilebilir.

Serebral I/R hasarının patofizyolojik mekanizmasında apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz rol alabilir ve inflamasyon bu mekanizmaya eşlik edebilir. Serebral I/R hasarında PostC ve RePostC apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptozu inhibe ederek antienflamatuvar mekanizmaları tetikleyerek koruyucu olabilir. Apaf-1, RIPK3, GasderminD, ACSL4, ZBP-1, TAK-1 ile Sesn 2 ve HK2 düzeyleri serebral I/R hasarının tedavisi için potansiyel bir hedef olabilir. PostC ve RePostC uygulaması ile endojen tolerans mekanizmalarını tetiklemek I/R hasarına karşı koruma sağlayabilir.

6.1. Öneriler

Çalışmamızdan 24 saat sonra alınan beyin dokularının Western Blot yöntemi kullanılarak protein analizi yapıldı. Beyin dokularına ek olarak serum örnekleri üzerinde de ilgili protein düzeyleri ölçülerek merkezi ve periferal etkiler arasında kıyasalama yapılabilir. Ayrıca davranış deneyleri reperfüzyonun sadece 24. saatinde değerlendirildi. Lökomotor aktiviteyi ölçmek için daha uzun zaman aralığında deneyler tekrarlanabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abe, T., Kunz, A., Shimamura, M., Zhou, P., Anrather, J., & Iadecola, C. (2009). The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(1), 66–72. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.88>
- Ahmad, S., Elsherbiny, N. M., Haque, R., Khan, M. B., Ishrat, T., Shah, Z. A., Khan, M. M., Ali, M., Jamal, A., Katare, D. P., Liou, G. I., & Bhatia, K. (2014). Sesamin attenuates neurotoxicity in mouse model of ischemic brain stroke. *NeuroToxicology*, 45, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.10.002>
- Althaus, J., Siegelin, M. D., Dehghani, F., Cilenti, L., Zervos, A. S., & Rami, A. (2007). The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion. *Neurochemistry International*, 50(1), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.07.018>
- Ann-Katrin Kraeuter, P. C. G. & Z. S. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In *Pre-Clinical Models* (Vol. 1897, Issue Figure 1, pp. 44–45).
- Anzell, A. R., Maizy, R., Przyklenk, K., & Sanderson, T. H. (2018). Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2547–2564. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0503-9>
- Aronowski, J., & Zhao, X. (2011). Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: Secondary brain injury. *Stroke*, 42(6), 1781–1786. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596718>
- Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Y. S. (2018). WSSPAS: An Interactive Web Application for Sample Size and Power Analysis with R Using Shiny*. *Biostat.*, 10(3).
- Arslan, R., Doganay, S., Budak, O., & Bahtiyar, N. (2024). Investigation of preconditioning and the protective effects of nicotinamide against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neuroscience Letters*, 840(August), 137949. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.137949>
- Barrington, J., Lemarchand, E., & Allan, S. M. (2017). A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology? *Brain Pathology*, 27(2), 205–212. <https://doi.org/10.1111/bpa.12476>
- Bayram S. (2014). *ODU Journal of Medicine*. 68–71.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski, H. M. (1986). Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*, 17(6), 1304–1308. <https://doi.org/10.1161/01.STR.17.6.1304>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Burda, J., Danielisová, V., Némethová, M., Gottlieb, M., Matiašová, M., Domoráková, I., Mechírová, E., Feriková, M., Salinas, M., & Burda, R. (2006). Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7–8), 1141–1151. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9036-x>

- Burdette, B. E., Esparza, A. N., Zhu, H., & Wang, S. (2021). Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *11*(9), 2768–2782. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.006>
- Chan, Y. K., Hong, C. F., Tsai, M. H., Chang, Y. L., & Sun, P. H. (2020). Image-based stroke rat brain atrophy volume and infarct volume computation. *Journal of Supercomputing*, *76*(12), 10090–10121. <https://doi.org/10.1007/s11227-020-03224-y>
- Chen, T., & Vunjak-novakovic, G. (2018). *In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury*. 142–153.
- Cheng, Z., Li, L., Mo, X., Zhang, L., Xie, Y., Guo, Q., & Wang, Y. (2014). Non-invasive remote limb ischemic postconditioning protects rats against focal cerebral ischemia by upregulating STAT3 and reducing apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, *34*(4), 957–966. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1873>
- Crupi, R., Di Paola, R., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2018). Middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method. *Methods in Molecular Biology*, *1727*, 393–401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_31
- Cui, Y., Cui, M., Wang, L., Wang, N., Chen, Y., Lv, S., Zhang, L., Chen, C., Yang, Y., Wang, F., Wang, L., & Cui, H. (2024). Huanglian Jiedu decoction alleviates ischemia-induced cerebral injury in rats by mitigating NET formation and activating GABAergic synapses. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *28*(15), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18528>
- Cui, Y., Lin, H., Ma, J., Zhao, Y., Li, J., Wang, Y., Zhuang, J., & Yang, Y. (2025). Ischemia-reperfusion injury induces ZBP1-dependent PANoptosis in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1871*(5), 167782. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2025.167782>
- Cui, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Shao, L., Liu, G., Sun, C., Xu, R., & Zhang, Z. (2021). ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *93*(June 2020), 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.01.003>
- Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X. Y., Xi, J., & Cheung, P. C. F. (2012). TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life*, *64*(10), 825–834. <https://doi.org/10.1002/iub.1078>
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., Veeresh, P., Kotian, V., Kalia, K., Borah, A., Wang, X., Dave, K. R., Yavagal, D. R., & Bhattacharya, P. (2020). Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*, *11*(6), 1185–1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>
- De Zio, D., Maiani, E., & Cecconi, F. (2015). Apaf1 in embryonic development-shaping life by death, and more. *International Journal of Developmental Biology*, *59*(1–3), 33–39. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150047dd>
- Demarco, B., Graczyk, J. P., Bjanec, E., Roy, D. Le, Tonnus, W., Assenmacher, C. A., Radaelli, E., Fettelet, T., Mack, V., Linkermann, A., Roger, T., Brodsky, I. E., Chen, K. W., & Broz, P. (2020). Caspase-8-dependent gasdermin D cleavage promotes antimicrobial defense but confers susceptibility to TNF-induced lethality. *Science Advances*, *6*(47), 1–15. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc3465>
- Dezfulian, C., Garrett, M., & Gonzalez, N. R. (2013). Clinical Application of Preconditioning and Postconditioning to Achieve Neuroprotection. *Translational Stroke Research*, *4*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0224-3>

- Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2024a). The Cell Biology of Ferroptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00703-5>
- Dong, Z., Pan, K., Pan, J., Peng, Q., & Wang, Y. (2018). The Possibility and Molecular Mechanisms of Cell Pyroptosis After Cerebral Ischemia. *Neuroscience Bulletin*, 34(6), 1131–1136. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0294-7>
- Dou, X., Dong, W., Gu, Y., Zhang, T., & Zhang, J. (2023). Significance of serum sestrin2 as a biomarker of severity and functional outcome in acute intracerebral hemorrhage: a prospective observational longitudinal study. *BMC Neurology*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12883-023-03470-6>
- Elsisi, H. A. (2025). Research Article Impact of Pheophytin A , L-Carnitine and Melatonin on Serum Levels of Malondialdehyde , Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Rats with Cerebral Ischemia / Reperfusion Injury. *International Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.3923/ijp.2025.86.91>
- Eshak, E. S., Honjo, K., Iso, H., Ikeda, A., Inoue, M., Sawada, N., & Tsugane, S. (2017). Changes in the Employment Status and Risk of Stroke and Stroke Types. *Stroke*, 48(5), 1176–1182. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016967>
- Esposito, E., Hayakawa, K., Maki, T., Arai, K., & Lo, E. H. (2015). Effects of Postconditioning on Neurogenesis and Angiogenesis during the Recovery Phase after Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, 46(9), 2691–2694. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009070>
- Fan, Y. Y., Hu, W. W., Nan, F., & Chen, Z. (2017). Postconditioning-induced neuroprotection, mechanisms and applications in cerebral ischemia. *Neurochemistry International*, 107, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.006>
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
- Fritsch, M., Günther, S. D., Schwarzer, R., Albert, M. C., Schorn, F., Werthenbach, J. P., Schiffmann, L. M., Stair, N., Stocks, H., Seeger, J. M., Lamkanfi, M., Krönke, M., Pasparakis, M., & Kashkar, H. (2019). Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784), 683–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>
- Greten, F. R., & Karin, M. (2004). The IKK/NF- κ B activation pathway - A target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Letters*, 206(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.08.029>
- Gul-Kahraman, K., Yilmaz-Bozoglan, M., & Sahna, E. (2019). Physiological and pharmacological effects of melatonin on remote ischemic preconditioning after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats: Role of Cybb, Fas, Nf κ B, Irisin signaling pathway. *Journal of Pineal Research*, 67(2), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jpi.12589>
- Hahn, C. D., Manliot, C., Schmidt, M. R., Nielsen, T. T., & Redington, A. N. (2011). Remote ischemic per-conditioning: A novel therapy for acute stroke? *Stroke*, 42(10), 2960–2962. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.622340>
- Halladin, N. L. øvland. (2015). Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Danish Medical Journal*, 62(4), B5054.

- Hao, S., Yuan, S., Liu, Z., Hou, B., Feng, S., & Zhang, D. (2024). Neuroprotective effects of takinib on an experimental traumatic brain injury rat model via inhibition of transforming growth factor beta-activated kinase 1. *Heliyon*, *10*(8), e29484. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29484>
- Hao, Y., Yang, B., Yang, J., Shi, X., Yang, X., Zhang, D., Zhao, D., Yan, W., Chen, L., Zheng, H., Zhang, K., & Liu, X. (2022). ZBP1: A Powerful Innate Immune Sensor and Double-Edged Sword in Host Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms231810224>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2011). The therapeutic potential of ischemic conditioning: An update. *Nature Reviews Cardiology*, *8*(11), 619–629. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.85>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 92–100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
- He, Z., Ning, N., Zhou, Q., Khoshnam, S. E., & Farzaneh, M. (2020). Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, *146*(August 2019), 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005>
- Hentia, C., Rizzato, A., Camporesi, E., Yang, Z., Muntean, D. M., Săndesc, D., & Bosco, G. (2018). An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain and Behavior*, *8*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1002/brb3.959>
- Hess, D. C., Blauenfeldt, R. A., Andersen, G., Hougaard, K. D., Hoda, M. N., Ding, Y., & Ji, X. (2015). Remote ischaemic conditioning—a new paradigm of self-protection in the brain. *Nature Reviews Neurology*, *11*(12), 698–710. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.223>
- Hess, D. C., Hoda, M. N., & Bhatia, K. (2013). Remote limb preconditioning and postconditioning: Will it translate into a promising treatment for acute stroke? *Stroke*, *44*(4), 1191–1197. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.678482>
- Hougaard, K. D., Hjort, N., Zeidler, D., SØrensen, L., NØrgaard, A., Hansen, T. M., Von Weitzel-Mudersbach, P., Simonsen, C. Z., Damgaard, D., Gottrup, H., Svendsen, K., Rasmussen, P. V., Ribe, L. R., Mikkelsen, I. K., Nagenthiraja, K., Cho, T. H., Redington, A. N., BØtker, H. E., Østergaard, L., ... Andersen, G. (2014). Remote ischemic preconditioning as an adjunct therapy to thrombolysis in patients with acute ischemic stroke: A randomized trial. *Stroke*, *45*(1), 159–167. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001346>
- Hribljan, V., Lisjak, D., Petrović, D. J., & Mitrečić, D. (2019). Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: From pathogenesis to therapeutic possibilities. *Croatian Medical Journal*, *60*(2), 121–126. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.121>
- Hu, Y., Cao, K., Wang, F., Wu, W., Mai, W., Qiu, L., Luo, Y., Ge, W. ping, Sun, B., Shi, L., Zhu, J., Zhang, J., Wu, Z., Xie, Y., Duan, S., & Gao, Z. (2022). Dual roles of hexokinase 2 in shaping microglial function by gating glycolytic flux and mitochondrial activity. *Nature Metabolism*, *4*(12), 1756–1774. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00707-5>
- Huang, K., Zhang, Q., Wan, H., Ban, X. X., Chen, X. Y., Wan, X. X., Lu, R., He, Y., & Xiong, K. (2025). TAK1 at the crossroads of multiple regulated cell death pathways: from molecular mechanisms to human diseases. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.70042>

- Jurcau, A., & Ardelean, I. A. (2021). Molecular pathophysiological mechanisms of ischemia/reperfusion injuries after recanalization therapy for acute ischemic stroke. *NeuroSignals*, *20*(3), 727–744. <https://doi.org/10.31083/j.jin2003078>
- Jurcau, A., & Simion, A. (2022). Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010014>
- Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P. F., Doll, S., Croix, C. S., Dar, H. H., Liu, B., Tyurin, V. A., Ritov, V. B., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., Jiang, J., Anthonymuthu, T., Mohammadyani, D., Yang, Q., Proneth, B., Klein-Seetharaman, J., Watkins, S., ... Baylr, H. (2017). Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, *13*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2238>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 298). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Ketelut-Carneiro, N., & Fitzgerald, K. A. (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *Journal of Molecular Biology*, *434*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>
- Lee, D. H., Lee, J. H., & Sung, Y. B. (2020). Effects of alternate training for motor skills on neurotrophic factors and gait in striatum stroke-induced rats. *International Journal of Current Research and Review*, *12*(16), 40–46. <https://doi.org/10.31782/IJCRR.2020.121624>
- Lee, J. H., Bodmer, R., Bier, E., & Karin, M. (2010). Sestrins at the crossroad between stress and aging. *Aging*, *2*(6), 369–374. <https://doi.org/10.18632/aging.100157>
- Lee, S., Lee, M., Hong, Y., Won, J., Lee, Y., Kang, S. G., Chang, K. T., & Hong, Y. (2014). Middle cerebral artery occlusion methods in rat versus mouse models of transient focal cerebral ischemic stroke. *Neural Regeneration Research*, *9*(7), 757–758. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.131582>
- Li, H., Zhou, S., Wu, L., Liu, K., Zhang, Y., Ma, G., & Wang, L. (2015). The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of the Neurological Sciences*, *357*(1–2), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.08.004>
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang, Huang, Z. jian, Lin, Z. tao, Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, *11*(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Li, P., Su, L., Li, X., Di, W., Zhang, X., Zhang, C., He, T., Zhu, X., Zhang, Y., & Li, Y. (2016). Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in mice. *International Journal of Neuroscience*, *126*(6), 552–559. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1042973>
- Li, Y., Lu, B., Sheng, L., Zhu, Z., Sun, H., Zhou, Y., Yang, Y., Xue, D., Chen, W., Tian, X., Du, Y., Yan, M., Zhu, W., Xing, F., Li, K., Lin, S., Qiu, P., Su, X., Huang, Y., ... Yin, W. (2018). Hexokinase 2-dependent hyperglycolysis driving microglial activation contributes to ischemic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, *144*(2), 186–200. <https://doi.org/10.1111/jnc.14267>

- Li, Z., Chen, H., Lv, J., & Zhao, R. (2017). The application and neuroprotective mechanisms of cerebral ischemic post-conditioning: A review. *Brain Research Bulletin*, *131*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.002>
- Liang, J., Luan, Y., Lu, B., Zhang, H., Luo, Y. N., & Ge, P. (2014). Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- κ B/p65 activation. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096734>
- Liang, J. min, Xu, H. yang, Zhang, X. jie, Li, X., Zhang, H. bo, & Ge, P. fei. (2013). Role of mitochondrial function in the protective effects of ischaemic postconditioning on ischaemia/reperfusion cerebral damage. *Journal of International Medical Research*, *41*(3), 618–627. <https://doi.org/10.1177/0300060513476587>
- Liao, S., Apaijai, N., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2020). The possible roles of necroptosis during cerebral ischemia and ischemia / reperfusion injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *695*(October), 108629. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108629>
- Lin, L., & Wang, W. (2016). Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, *5*(4), 1–16. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000213>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, *535*(7610), 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
- Liu, Z. J., Chen, C., Li, X. R., Ran, Y. Y., Xu, T., Zhang, Y., Geng, X. K., Zhang, Y., Du, H. S., Leak, R. K., Ji, X. M., & Hu, X. M. (2016). Remote Ischemic Preconditioning-Mediated Neuroprotection against Stroke is Associated with Significant Alterations in Peripheral Immune Responses. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *22*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1111/cns.12448>
- Long, J., Sun, Y., Liu, S., Yang, S., Chen, C., Zhang, Z., Chu, S., Yang, Y., Pei, G., Lin, M., Yan, Q., Yao, J., Lin, Y., Yi, F., Meng, L., Tan, Y., Ai, Q., & Chen, N. (2023). Targeting pyroptosis as a preventive and therapeutic approach for stroke. *Cell Death Discovery*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01440-y>
- Ludwig, J., Gorodetskaya, N., Schattschneider, J., Jänig, W., & Baron, R. (2007). Behavioral and sensory changes after direct ischemia-reperfusion injury in rats. *European Journal of Pain*, *11*(6), 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2006.10.005>
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P. E., Skeen, J. E., Gottlob, K., Chandel, N. S., Thompson, C. B., Robey, R. B., & Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular Cell*, *16*(5), 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.014>
- Malhotra, S., Naggar, I., Stewart, M., & Rosenbaum, D. M. (2011). Neurogenic pathway mediated remote preconditioning protects the brain from transient focal ischemic injury. *Brain Research*, *1386*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.032>
- Murphy, J. M., & Vince, J. E. (2015). Post-translational control of RIPK3 and MLKL mediated necroptotic cell death. *F1000Research*, *4*(0), 1–13. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7046.1>

- Mutoh, T., Kikuchi, H., Jitsuishi, T., Kitajo, K., & Yamaguchi, A. (2023). Spatiotemporal expression patterns of ZBP1 in the brain of mouse experimental stroke model. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *134*(November), 102362. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102362>
- Naito, H., Nojima, T., Fujisaki, N., Tsukahara, K., Yamamoto, H., Yamada, T., Aokage, T., Yumoto, T., Osako, T., & Nakao, A. (2020). Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine. *Acute Medicine & Surgery*, *7*(1). <https://doi.org/10.1002/ams2.501>
- Naito, M. G., Xu, D., Amin, P., Lee, J., Wang, H., Li, W., Kelliher, M., Pasparakis, M., & Yuan, J. (2020). Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(9), 4959–4970. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916427117>
- Neubert, M., Ridder, D. A., Bargiotas, P., Akira, S., & Schwaninger, M. (2011). Acute inhibition of TAK1 protects against neuronal death in cerebral ischemia. *Cell Death and Differentiation*, *18*(9), 1521–1530. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.29>
- Newton, K., Dugger, D. L., Wickliffe, K. E., Kapoor, N., De Almagro, M. C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R. E., French, D. M., Webster, J., Roose-Girma, M., Warming, S., & Dixit, V. M. (2014). Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science*, *343*(6177), 1357–1360. <https://doi.org/10.1126/science.1249361>
- Newton, K., Wickliffe, K. E., Dugger, D. L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., Kömüves, L., Webster, J. D., & Dixit, V. M. (2019). Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, *574*(7778), 428–431. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1548-x>
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals—a review. *Brazilian Journal of Biology*, *81*(4), 1133–1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Oladapo, A., Jackson, T., Menolascino, J., & Periyasamy, P. (2024). Role of pyroptosis in the pathogenesis of various neurological diseases. *Brain Behavior and Immunity*, *117*(December 2023), 428–446. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.02.001>
- Ornella, C., Serenella, A., Paola, B., Pasquale, C., Giovanna, L., Viviana, V., Antonio, V., Lucio, A., & Giuseppe, P. (2024). Systemic administration of blood-derived exosomes induced by remote ischemic post-conditioning, by delivering a specific cluster of miRNAs, ameliorates ischemic damage and neurological function. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. <https://doi.org/10.1177/0271678X241270284>
- Park, S., Shin, J., Hong, Y., Kim, S., Lee, S., Park, K., Lkhagvasuren, T., Lee, S. R., Chang, K. T., & Hong, Y. (2012). Forced exercise enhances functional recovery after focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain Sciences*, *2*(4), 483–503. <https://doi.org/10.3390/brainsci2040483>
- Patel, P., Barve, K., & Bhatt, L. K. (2022). Narirutin-rich fraction from grape fruit peel protects against transient cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Nutritional Neuroscience*, *25*(5), 920–930. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1821518>

- Possomato-Vieira, José S. and Khalil, R. A. K., & Modeling, O. 2. 0: E. S. E. and S. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160006>. Ischemia/Reperfusion
- Powers, W. (2020). Acute Ischemic Stroke William J. Powers, M.D. *N Engl J Med*, 383(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1917030>
- Qi, W., Zhou, F., Li, S., Zong, Y., Zhang, M., Lin, Y., Zhang, X., Yang, H., Zou, Y., Qi, C., Wang, T., & Hu, X. (2016). Remote ischemic postconditioning protects ischemic brain from injury in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion associated with suppression of TLR4 and NF- κ B expression. *NeuroReport*, 27(7), 469–475. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000553>
- Qin, C., Yang, S., Chu, Y. H., Zhang, H., Pang, X. W., Chen, L., Zhou, L. Q., Chen, M., Tian, D. S., & Wang, W. (2022). Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>
- Ramagiri, S., & Taliyan, R. (2017). Remote limb ischemic post conditioning during early reperfusion alleviates cerebral ischemic reperfusion injury via GSK-3 β /CREB/ BDNF pathway. *European Journal of Pharmacology*, 803(December 2016), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.028>
- Rao, Z., Zhu, Y., Yang, P., Chen, Z., Xia, Y., Qiao, C., Liu, W., Deng, H., Li, J., Ning, P., & Wang, Z. (2022). Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics*, 12(9), 4310–4329. <https://doi.org/10.7150/THNO.71086>
- Ren, C., Gao, X., Steinberg, G. K., & Zhao, H. (2008). Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience*, 151(4), 1099–1103. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.056>
- Riegman, M., Sagie, L., Galed, C., Levin, T., Steinberg, N., Dixon, S. J., Wiesner, U., Bradbury, M. S., Niethammer, P., Zaritsky, A., & Overholtzer, M. (2020). Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture. *Nature Cell Biology*, 22(9), 1042–1048. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0565-1>
- Schuman, J., Chen, Y., Podd, A., Yu, M., Liu, H. H., Wen, R., Chen, Z. J., & Wang, D. (2009). A critical role of TAK1 in B-cell receptor-mediated nuclear factor κ B activation. *Blood*, 113(19), 4566–4574. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-176057>
- Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current Neuropharmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180302115544>
- ŞENOL, Ş. P., & TUNÇTAN, B. (2016). Myocardial and Renal Ischemia/Reperfusion Injury and Experimental Models: Review. *Turkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 5(2), 93–109. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2015-47990>
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2017). Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.001>

- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2021). Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimie*, *190*, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.07.004>
- She, X., Lan, B., Tian, H., & Tang, B. (2020). Cross Talk Between Ferroptosis and Cerebral Ischemia. *Frontiers in Neuroscience*, *14*(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00776>
- Shen, L., Gan, Q., Yang, Y., Reis, C., Zhang, Z., Xu, S., Zhang, T., & Sun, C. (2021). Mitophagy in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.687246>
- Shi, X., Xu, L., Doycheva, D. M., Tang, J., Yan, M., & Zhang, J. H. (2017). Sestrin2, as a negative feedback regulator of mTOR, provides neuroprotection by activation AMPK phosphorylation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rat pups. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *37*(4), 1447–1460. <https://doi.org/10.1177/0271678X16656201>
- Shi, X., Xu, L., Malagult, J., Tang, J., Yan, M., & Zhang, J. H. (2016). Sestrins: A New Kid for Stroke Treatment? *Current Drug Delivery*, *14*(6), 797–806. <https://doi.org/10.2174/1567201814666161111125249>
- Stockwell, B. R., & Jiang, X. (2020). The Chemistry and Biology of Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*, *27*(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.013>
- Sun, J., Tong, L., Luan, Q., Deng, J., Li, Y., Li, Z., Dong, H., & Xiong, L. (2012). Protective effect of delayed remote limb ischemic postconditioning: Role of mitochondrial K ATP channels in a rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *32*(5), 851–859. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.199>
- Sun, X., Yang, Y., Meng, X., Li, J., Liu, X., & Liu, H. (2024). PANoptosis: Mechanisms, biology, and role in disease. *Immunological Reviews*, *321*(1), 246–262. <https://doi.org/10.1111/imr.13279>
- Sun, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Li, J., Jin, L., Sun, Y., Shi, N., Liu, K., & Sun, X. (2018). Ischemic Postconditioning Alleviates Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury Through Activating Autophagy During Early Reperfusion in Rats. *Neurochemical Research*, *43*(9), 1826–1840. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2599-3>
- Sun, Z., Baker, W., Hiraki, T., & Greenberg, J. H. (2012). The effect of right vagus nerve stimulation on focal cerebral ischemia: An experimental study in the rat. *Brain Stimulation*, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.01.009>
- Sweis, B. M., Bachour, S. P., Brekke, J. A., Gewirtz, J. C., Sadeghi-Bazargani, H., Hevesi, M., & Divani, A. A. (2016). A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*, *296*, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.015>
- Tang, D., Chen, X., Kang, R., & Kroemer, G. (2021). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, *31*(2), 107–125. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1>
- Toyokuni, S., Ito, F., Yamashita, K., Okazaki, Y., & Akatsuka, S. (2017). Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *108*(December 2016), 610–626. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024>

- Tuo, Q. zhang, Zhang, S. ting, & Lei, P. (2022). Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews*, 42(1), 259–305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>
- Uzdensky, A. B. (2019). Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, 24(9–10), 687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
- Vinten-Johansen, J., & Shi, W. (2011). Preconditioning and postconditioning: Current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 16(3–4), 260–266. <https://doi.org/10.1177/1074248411415270>
- Vishwakarma, V. K., Upadhyay, P. K., Gupta, J. K., & Yadav, H. N. (2017). Pathophysiologic role of ischemia reperfusion injury: A review. *Journal of Indian College of Cardiology*, 7(3), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jicc.2017.06.017>
- Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>
- Wang, A. rong, Mi, L. fang, Zhang, Z. lei, Hu, M. zhe, Zhao, Z. yu, Liu, B., Li, Y. bin, & Zheng, S. (2021). Saikosaponin A improved depression-like behavior and inhibited hippocampal neuronal apoptosis after cerebral ischemia through p-CREB/BDNF pathway. *Behavioural Brain Research*, 403(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113138>
- Wang, J. (2010). Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Progress in Neurobiology*, 92(4), 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.08.001>
- Wang, J. K., Wu, H. F., Zhou, H., Yang, B., & Liu, X. Z. (2015). Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel and mitochondrial permeability transition pore. *Neurological Research*, 37(1), 77–83. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000410>
- Wang, K., Sun, Q., Zhong, X., Zeng, M., Zeng, H., Shi, X., Li, Z., Wang, Y., Zhao, Q., Shao, F., & Ding, J. (2020). Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Autoprocessed Caspases in Pyroptosis. *Cell*, 180(5), 941–955.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.002>
- Wang, P., Zhao, Y., Li, Y., Wu, J., Yu, S., Zhu, J., Li, L., & Zhao, Y. (2019). Sestrin2 overexpression attenuates focal cerebral ischemic injury in rat by increasing Nrf2/HO-1 pathway-mediated angiogenesis. *Neuroscience*, 410, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.005>
- Wang, S., Yin, J., Ge, M., Dai, Z., Li, Y., Si, J., Ma, K., Li, L., & Yao, S. (2016). Transforming growth-beta 1 contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 78, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.030>
- Wang, Y., & Kanneganti, T. D. (2021). From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 4641–4657. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.038>
- Wang(b), J., Wang, S., Xiao, M., Zhang, J., Wang(a), J., Guo, Y., Tang, Y., & Gu, J. (2021). Regulatory mechanisms of Sesn2 and its role in multi-organ diseases. *Pharmacological Research*, 164(December 2020), 105331. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105331>

- Wei, D., Xiong, X., & Zhao, H. (2015). Tim-3 cell signaling and iNOS are involved in the protective effects of ischemic postconditioning against focal ischemia in rats. *Metabolic Brain Disease*, *30*(2), 483–490. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9543-2>
- Wu, B., Luo, H., Zhou, X., Cheng, C. yi, Lin, L., Liu, B. lin, Liu, K., Li, P., & Yang, H. (2017). Succinate-induced neuronal mitochondrial fission and hexokinase II malfunction in ischemic stroke: Therapeutical effects of kaempferol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1863*(9), 2307–2318. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.011>
- Wu, D., Zhang, H., Wu, Q., Li, F., Wang, Y., Liu, S., & Wang, J. (2021). Sestrin 2 protects against LPS-induced acute lung injury by inducing mitophagy in alveolar macrophages. *Life Sciences*, *267*(July 2020), 118941. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118941>
- Wu, H., Yang, S. F., Dai, J., Qiu, Y. M., Miao, Y. F., & Zhang, X. H. (2015). Combination of early and delayed ischemic postconditioning enhances brain-derived neurotrophic factor production by upregulating the ERK-CREB pathway in rats with focal ischemia. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 6427–6434. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4327>
- Wu, Q., Que, W., Zhang, J., Chen, X., Wang, M., Kou, J., & Chen, G. (2024). Enhanced effect of limb remote ischemic postconditioning combined with paeoniflorin on alleviating cerebral ischemic injury via neutrophil NADPH pathway. *Brain Research Bulletin*, *214*(May), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.111006>
- Yan, J., Xu, W., Lenahan, C., Huang, L., Wen, J., Li, G., Hu, X., Zheng, W., Zhang, J. H., & Tang, J. (2021). CCR5 activation promotes NLRP1-dependent neuronal pyroptosis via CCR5/PKA/CREB pathway after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, *52*(12), 4021–4032. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.033285>
- Yan, M. Y., Liu, J. M., Wu, J., & Chang, Q. (2024). Impact of remote ischemic postconditioning on acute ischemic stroke in China: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Systematic Reviews*, *13*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13643-024-02568-3>
- Yan, W. T., Yang, Y. Di, Hu, X. M., Ning, W. Y., Liao, L. S., Lu, S., Zhao, W. J., Zhang, Q., & Xiong, K. (2022). Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral ischemia? Evidence from cell and rodent studies. *Neural Regeneration Research*, *17*(8), 1761–1768. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.331539>
- Yang, Y., Ding, H., Yang, C., Wu, J., Bao, Y., Lan, S., Zhou, L., Zhou, L., Liu, B., Hong, T., Wan, X., & Wu, X. (2023). Sestrin2 provides cerebral protection through activation of Nrf2 signaling in microglia following subarachnoid hemorrhage. *Frontiers in Immunology*, *14*(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1089576>
- Yang-Wei Fann, D., Lee, S. Y., Manzanero, S., Tang, S. C., Gelderblom, M., Chunduri, P., Bernreuther, C., Glatzel, M., Cheng, Y. L., Thundyil, J., Widiapradja, A., Lok, K. Z., Foo, S. L., Wang, Y. C., Li, Y. I., Drummond, G. R., Basta, M., Magnus, T., Jo, D. G., ... Arumugam, T. V. (2013). Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death and Disease*, *4*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.326>
- Yılmaz, Ü. (2020). Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Otofaji Üzerine Melatoninin Etkilerinin Araştırılması. In *Jurnal Berkala Epidemiologi* (Vol. 5, Issue 1).

- <https://core.ac.uk/download/pdf/235085111.pdf> website:
<http://www.kemkes.go.id> <http://www.yankes.kemkes.go.id/assets/downloads/PMK> No. 57 Tahun 2013 tentang PTRM. https://www.kemennpppa.go.id/lib/uploads/list/15242-profil-anak-indonesia_-201
- Yu, L., Fan, S. J., Liu, L., Xiao, M., Lin, X. J., Liu, Y., Lv, H. X., Chen, X. L., & Liu, J. X. (2015). Effect of ischemic postconditioning on cerebral edema and the AQP4 expression following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *World Journal of Pediatrics*, *11*(2), 165–170. <https://doi.org/10.1007/s12519-014-0519-4>
- Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., & Chen, X. (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
- Yuan, J., & Ofengeim, D. (2023). A guide to cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00689-6>
- Yulug, B., Cam, E., Yildiz, A., & Kilic, E. (2007). Buprenorphine Does Not Aggravate Ischemic Neuronal Injury in Experimental Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuropsychiatry*, *19*(3), 331–334. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.19.3.331>
- Yun, H.-S., Park, M.-S., Ji, E.-S., Kim, T.-W., Ko, I.-G., Kim, H.-B., & Kim, H. (2014). Treadmill exercise ameliorates symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder through reducing Purkinje cell loss and astrocytic reaction in spontaneous hypertensive rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, *10*(1), 22–30. <https://doi.org/10.12965/jer.140092>
- Zahid, A., Ismail, H., & Jin, T. (2021). Molecular and structural aspects of gasdermin family pores and insights into gasdermin-elicited programmed cell death. *Biochemical Society Transactions*, *49*(6), 2697–2710. <https://doi.org/10.1042/BST20210672>
- Zhang, Q., Jia, M., Wang, Y. F., Wang, Q., & Wu, J. (2022). Cell Death Mechanisms in Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury. *Neurochemical Research*, *47*(12), 3525–3542. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03697-8>
- Zhang, T., Zhang, Y., Cui, M., Jin, L., Wang, Y., Lv, F., Liu, Y., Zheng, W., Shang, H., Zhang, J., Zhang, M., Wu, H., Guo, J., Zhang, X., Hu, X., Cao, C. M., & Xiao, R. P. (2016). CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nature Medicine*, *22*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1038/nm.4017>
- Zhang, X., Yan, H., Yuan, Y., Gao, J., Shen, Z., Cheng, Y., Shen, Y., Wang, R. R., Wang, X., Hu, W. W., Wang, G., & Chen, Z. (2013). Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy*, *9*(9), 1321–1333. <https://doi.org/10.4161/auto.25132>
- Zhang, Y., Cao, R. Y., Jia, X., Li, Q., Qiao, L., Yan, G., & Yang, J. (2016). Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia–reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *12*, 3161–3173. <https://doi.org/10.2147/NDT.S121779>
- Zhao, B., Shah, P., Budanov, A. V., Qiang, L., Ming, M., Aplin, A., Sims, D. M., & He, Y. Y. (2014). Sestrin2 protein positively regulates AKT enzyme signaling and survival in human squamous cell

- carcinoma and melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35806–35814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595397>
- Zhao, H., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2006). Interrupting reperfusion as a stroke therapy: Ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(9), 1114–1121. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600348>
- Zheng, Y., Hou, J., Liu, J., Yao, M., Li, L., Zhang, B., Zhu, H., & Wang, Z. (2014). Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 124(3), 354–364. <https://doi.org/10.1254/jphs.13220FP>
- Zhu, P., Ke, Z. R., Chen, J. X., Li, S. J., Ma, T. L., & Fan, X. L. (2023). Advances in mechanism and regulation of PANoptosis: Prospects in disease treatment. *Frontiers in Immunology*, 14(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1120034>



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sümeyye KESKİN	
Program/Anabilim Dalı: Tezli Yüksek Lisans Programı/Tıbbi Farmakoloji	
Eğitim Bilgileri	
Yüksek Lisans: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı	
Lisans: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2017-2022)	
Araştırma Deneyimi	
1	Miyokardiyal iskemi/reperfüzyon <i>in vivo</i> deneysel modeli
2	Serebral iskemi/reperfüzyon <i>in vivo</i> deneysel modeli
3	Kortikal beyin dilimlerinde iskemi/reperfüzyon deneysel modeli
4	Hücre ve doku kültürü teknikleri
İş Deneyimi	
1	2023-2024: Artvin Çoruh Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu/Öğretim Görevlisi
2	2024-Devam ediyor: Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı/Araştırma Görevlisi
Akademik Eserler Listesi	
No	Yazar(lar), Tarih, Eser Adı, Eser künyesi
1	Aslan, G., Keskin S. , Özdemir Z. & Şahna E. (2023). İskemik Ardkoşullanma ve Mitofaji İnhibitörü Mdivi-1'in Miyokardiyal Nekroz Alanı Üzerine Etkileri. 2. Uluslararası 27. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, Türkiye.
2	Keskin S. , Tanbek K.. & Şahna E. (2024). Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarında Uzak İskemik Ardkoşullanmanın ACSL-4 ve Sestrin2 Düzeyleri Üzerine Etkileri. 22. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İstanbul, Türkiye.
3	Keskin S. , Tanbek K.. & Şahna E. (2025). İskemik Ardkoşullanmanın Deneysel Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarında Nekroptoz ve Piroptoz Üzerine Etkileri. 23. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İzmir, Türkiye.

- 4** **Keskin S.,** Tanbek K.. & Şahna E. (2025). Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarında Uzak İskemik Ardkoşullanmanın Ferroptozda Görevli Glutasyon Peroksidaz 4 (GPX4) ve Araşidonik Asit 12-Lipoksijenaz (ALOX12) Üzerine Etkileri. 23. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İzmir, Türkiye.

