



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**ROSMARİNİK ASİDİN İZOFLURANA BAĞLI APOPTOZ
ve KOGNİTİF DİSFONKSİYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

Serdar DEMİRGAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR**

Şubat, 2025

İSTANBUL

Bu çalışma, 12.02.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Kerem ERKALP
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Kardiyoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Osman Bilgin GÜLÇİÇEK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2021-37893 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Moleküler biyoloji ve genetik alanında gerçekleştirdiğim bu çalışma, yalnızca akademik bir yolculuk değil, aynı zamanda kişisel bir gelişim süreci olmuştur. Hekimlik mesleğimle adım attığım akademik hayatımın farklı bir dönemini oluşturan İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde geçirdiğim süreç bu açıdan en fazla olgunlaştığım dönem oldu. Kendi fikrimce, gerçek manada bilimin ürettiği merkezler olan enstitülerin bilimsel çalışmalarını gerçekleştirmek için karşılaştıkları maddi zorlukları yakından gördüm. Tüm bu zorluklara rağmen bilim üretme aşkıyla herkesin elinden geleni yaptığını gözlemleme fırsatı buldum. Türkiye Cumhuriyeti Devletinin kurucusu büyük önder **Mustafa Kemal ATATÜRK**'ün “Hayatta en hakiki mürşit ilimdir” sözüne istinaden, bilimsel ilerleme konusundan elimizden geleni yapmak ve zorluklara göğüs germek boynumuzun borcudur. Bunun için muhtaç olduğumuz kudret damarlarımızdaki asil kanda mevcuttur.

Tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**'a, bu zorlu yolculukta sağladığı değerli rehberlik ve destek için minnettarım. Bilimsel bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösterdiği gibi, araştırma sürecinde karşılaştığım zorlukları aşmamda da büyük bir destek sağladı. Onun teşvikleri ve eleştirileri, bu çalışmanın kalitesini artırmamda önemli bir rol oynamıştır. Bundan sonraki süreçte de birçok kaliteli çalışmaya birlikte imza atacağımız inancındayım.

Tez çalışmam için verdikleri fikirlerle yardımcı ve destek olan Tez İzleme Komitesi üyelerine ve tez jürime teşekkürlerimi sunarım. Öncelikle, her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim, ilk tanıştığımız andan itibaren akademik açıdan ilerlememde büyük destek olmanın yanında hayatın her alanında yol gösterici olan canım abim, hocam **Prof. Dr. Kerem ERKALP**'e teşekkürü borç bilirim. Uzun yıllar tanışmışlık ve dostluğun yanında doktora eğitimim süresince yanımda olan, desteklerini esirgemeyen hocam **Doç. Dr. Murat PEKMEZ**'e yardımları için teşekkürlerimi sunarım. Tez savunmamda jüri üyesi yapan hocalarım **Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA** ve **Doç. Dr. Osman Bilgin GÜLÇİÇEK**'e de değerli katkıları için minnettarım. Ayrıca doktora eğitimimde üzerimde emeği geçen İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitime başladığım ilk andan itibaren hep yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, moleküler biyoloji ve genetik alanındaki bilgi ve görgülerinden her zaman faydalandığım, birlikte çalışmaktan keyif aldığım **Dr. Aslıhan ŞENGELN** ve **Dr. Yunus AKSÜT**'e özellikle teşekkür ederim. Ayrıca, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü proteomik ailesine de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan eşim, hafızamdaki tüm güzel anıların başrolü **Dr. Ebru Burcu DEMİRGAN**' a, sabrı ve anlayışı için teşekkür ederim. Destekleyici varlığı, bu zorlu yolculukta bana güç verdi. Sadece bu süreçte değil hayatımın en zor anlarında ayakta durma direncim oldu. Ayrıca, çocuklarım **Ada DEMİRGAN** ve **Mete DEMİRGAN**' a, hayatıma kattıkları neşe ve mutluluk için teşekkür ediyorum. Onların varlığı, her zorluğun üstesinden gelmemde bana ilham kaynağı oldu. Sağlıklı bir şekilde büyüdüklerini görmek bu hayattaki

en büyük dileğim. Onlara verebileceğim en büyük tavsiye, hayatları boyunca mutlu olmak için ellerinden geleni yapmalarıdır.

Son olarak, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem **Havva DEMİRGAN**'a, babam **Erdoğan DEMİRGAN**'a, kardeşlerim **Zeynep ÖNDERMAN** ve **Hülya ÖZKAN**'a minnetlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Şubat 2025

Serdar DEMİRGAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. GENEL ANESTEZİ	6
2.1.1. İnhalasyon Anesteziklerinin Tarihçesi	8
2.1.2. İnhalasyon Anesteziklerinin Etki Mekanizması	9
2.2. İZOFLURAN ANESTEZİSİ VE NÖROKOGNİTİF BOZUKLUKLAR	12
2.3. ROSMARİNİK ASİT	17
2.3.1. Rosmarinik Asitin Biyokoruyucu Etkileri	18
2.4. STRES PROTEİNLERİ.....	23
2.4.1. Isı Şoku Proteinleri	24
2.4.2. 14-3-3 Proteinleri.....	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. DENEY HAYVANLARI VE ETİK BİLDİRİMİ	29
3.2. İZOFLURAN ANESTEZİSİ UYGULAMASI	29
3.3. İNTRANAZAL ROSMARİNİK ASİT UYGULAMASI	31
3.4. DENEYSEL TASARIM VE ÇALIŞMA GRUPLARI	31
3.5. MORRİS SU LABİRENTİ (MWM) DENEYLERİ.....	32
3.6. BEYİN DOKULARININ HAZIRLANMASI.....	35
3.7. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER.....	36
3.7.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama	36
3.7.2. İmmünohistokimyasal (IHC) Boyama.....	36
3.8. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	37
3.8.1. Dokudan Protein İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini	37

3.8.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve İmmüno­blotlama.....	38
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. PİLOT ÇALIŞMA SONUÇLARI.....	43
4.1.1. İzofluran Anesteziği Pilot Çalışması Sonuçları.....	43
4.1.2. Rosmarinik Asit Uygulamasına Ait Pilot Çalışma Sonuçları.....	45
4.2. MORRİS SU LABİRENTİ (MWM) DENEYLERİNE AİT SONUÇLAR.....	46
4.2.1. Morris Su Labirenti Öğrenme Fazı Sonuçları.....	46
4.2.2. Morris Su Labirenti Hafıza Fazı Sonuçları.....	47
4.3. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERE AİT SONUÇLAR.....	51
4.4. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR.....	53
4.4.1. Apoptotik Yanıt ile İlişkili Analizler.....	53
4.4.2. Oksidatif ve İnflamatuar Yanıt ile İlişkili Analizler.....	54
4.4.3. Stres Proteinlerinin Ekspresyon Seviyelerine İlişkin Analizler.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	68
EKLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: 1840-2000 yılları arasında piyasaya sürülen anestezi ajanları (Frost, 2014).	9
Şekil 2.2: Anestezi indüksiyonu (kırmızı oklar) ve anesteziden çıkış (mavi oklar) sırasında inhalasyon anestezi ajanının etki yolu. Büyük oklar net hareketin yönünü gösterir. (Malik, 2021).	10
Şekil 2.3: Meyer-Overton korelasyonu (Kopp ve diğ., 2009).	10
Şekil 2.4: Anestetiğe bağlı lipid çift tabakası ekspansiyonu hipotezi (Frost, 2014).	11
Şekil 2.5: İzofluranın kimyasal yapısı (Wade ve Stevens, 1981).	12
Şekil 2.6: Rosmarinik asidin kimyasal yapısı.	17
Şekil 2.7: Rosmarinik asidin insan sağlığı üzerindeki farmakolojik etkileri (Noor ve diğ., 2022).	18
Şekil 2.8: Rosmarinik asidin sinir sistemi bozuklukları üzerindeki etki mekanizmaları (Ghasemzadeh Rahbardar ve Hosseinzadeh, 2020).	21
Şekil 2.9: Beyne ilaç iletiminde intranasal yolun şematik gösterimi (Emad ve diğ., 2021).	23
Şekil 3.1: Pleksiglas kutu içerisinde anestezi uygulaması.	30
Şekil 3.2: Deneysel protokolün şematik gösterimi.	32
Şekil 3.3: MWM deneylerinin gerçekleştirildiği oda konfigürasyonu. (a) Su tankı ve kaçış platformu, (b) Kesikli gri çizgiler MWM testinin dört kadranı gösterir: Kuzeydoğu (KD), Kuzeybatı (KB), Güneydoğu (GD) ve Güneybatı (GB). Kırmızı kesikli çizgiler ile havuz duvarı arasındaki alan tigmotaksis alanını temsil eder. (c) Su sıcaklığını ayarlayan ısıtıcı. (d) Deney kaydını sağlayan tavana monte edilmiş kamera. (e) İndirekt aydınlatma. (f) Farklı şekil, boyut ve renklerdeki görsel ipuçları. (g) Test alanını, deney yapan araştırmacı ve diğer faktörlerden ayıran paravan.	34
Şekil 4.1: İzofluran (İZO) anestezisi pilot çalışması sonuçları. İZO'nun hipokampus, serebellum ve korteks beyin bölümlerinde hasar verici etkisinin (A) hematoxylin-eozin (HE) boyama ile (B) protein seviyelerinde western blot (WB) ile değerlendirilmesi. (C) HE ve WB analizlerine ait istatistiksel analiz grafikleri. (ns – “not significant”; *aynı beyin bölümüne ait grupların # ise farklı beyin bölümlerine ait grupların karşılaştırmasını gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$). Cas: kaspaz.	44

- Şekil 4.2:** Rosmarinik asit uygulamasına ait pilot çalışma sonuçları. Hipokampus beyin bölümünde gerçekleştirilen protein izolasyonu sonrasında (A) Bax seviyesi, (B) Bcl-2 seviyesi (C) Bax/Bcl-2 oranı ve (D) aktif kaspaz-3 (Cas-3 p19/17) seviyesi (E) western blot analizi ile değerlendirildi. (ns – “not significant”; *gruplar arası kıyaslamayı gösterir; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).....45
- Şekil 4.3:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) öğrenme üzerine koruyucu etkilerinin P28-32’de Morris su labirenti (MWM) testi ile değerlendirilmesi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B) Kaçış platformunu bulma süresi. (C) Havuz içerisinde yüzme rotaları. (D) Tigmotaksis yüzdeleri. (E) Yüzme hızları. (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$).....46
- Şekil 4.4:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P33’te Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B) Havuz içerisinde yüzme rotaları. (C) Tigmotaksis yüzdeleri. (D) Yüzme hızları. (E) Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. (F) Eski platform yerinden geçiş sayısı. (G) Hedef kadranda dışında geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$).....48
- Şekil 4.5:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P60’ta Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B) Havuz içerisinde yüzme rotaları. (C) Tigmotaksis yüzdeleri. (D) Yüzme hızları. (E) Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. (F) Eski platform yerinden geçiş sayısı. (G) Hedef kadranda dışında geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$).....49
- Şekil 4.6:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P90’da Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B) Havuz içerisinde yüzme rotaları. (C) Tigmotaksis yüzdeleri. (D) Yüzme hızları. (E) Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. (F) Eski platform yerinden geçiş sayısı. (G) Hedef kadranda dışında geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; ## $P<0.01$).....51
- Şekil 4.7:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus CA1 bölgesindeki hasarlı ve apoptotik hücrelerin histopatolojik analizi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B-C) HE boyama ve IHC ile aktif kaspaz-3 işaretleme sonuçları (skala bar: 50 μ m; büyütme: $\times 400$) (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$).....52

- Şekil 4.8:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde apoptotik yanıtın Western blot yöntemiyle analizi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B-C) Western blot ile Bax/Bcl-2 oranının, kaspaz-3 p19/17 ve PARP1 p89 fragmentleri seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.01$). 53
- Şekil 4.9:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde oksidatif ve inflamatuvar yanıtın western blot yöntemiyle analizi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B-C) Western blot ile SOD1, GPX1, NF- κ B p65, TNF- α ve 4HNE seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.01$). 55
- Şekil 4.10:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde stres proteinlerinin seviyelerinin western blot yöntemiyle analizi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B-C) Western blot ile p-HSF1, Hsp90, Hsp70 ve Hsp60 seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$). 56
- Şekil 4.11:** Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde 14-3-3 protein seviyelerinin western blot yöntemiyle analizi. (A) Çalışma zaman çizelgesi. (B-C) Western blot ile 14-3-3 izoformlarının (β , γ , ϵ , ζ , σ , θ/τ ve η) seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$). 57

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Neonatal dönemde izofluran maruziyetinin olumsuz etkilerini gösteren <i>in vivo</i> ve klinik çalışmalar.	16
Tablo 3.1: MWM testinin öğrenme fazında ratların havuza bırakılma noktaları.	33
Tablo 3.2: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli hacimler).	38
Tablo 3.3: SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	39
Tablo 3.4: Elektrotransfer, immünoblotlama ve “stripping” işlemlerinde kullanılan çözeltiler.	40
Tablo 3.5: İmmünoblotlama deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
<	: Küçük
=	: Eşit
>	: Büyük
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
lx	: Lüks (Aydınlatma birimi)
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmHg	: Milimetre cıva
°C	: Derece Santigrat
s	: Saniye
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
ε	: Epsilon
ζ	: Zeta
η	: Eta
θ/τ	: Teta/tau
σ	: Sigma

Kısaltmalar	Açıklama
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
ARRIVE	: “Animal Research: Reporting of <i>in vivo</i> Experiments”
CAT	: Katalaz (“Catalase”)
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi (“Central Nervous System”)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FDA	: “The U.S. Food and Drug Administration”
GAS	: “General Anesthesia Spinal”
HE	: Hematoksilen-eozin
HSF	: Isı şoku faktörü (“Heat Shock Factor”)
Hsp	: Isı şoku proteini (“Heat Shock Protein”)
HSR	: Isı şoku yanıtı (“Heat Shock Response”)
IHC	: İmmünohistokimyasal boyama
IL	: İnterlökin (“İnterleukin”)
İZO	: İzofluran
MAC	: “Minimum alveolar concentration”
MASK	: “Mayo Anesthesia Safety in Kids”
MDA	: Malondialdehit
MWM	: Morris Su Labirenti (“Morris Water Maze”)
NF-κB	: “Nuclear Factor-kappa B”
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri (“National Institutes of Health”)
NMDA	: N-metil-D-aspartat
P	: Postnatal gün
PANDA	: “Pediatric Anesthesia Neurodevelopmental Assessment”
PBS	: “Phosphate Buffered Saline”
RA	: Rosmarinik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türü (“Reactive Oxygen Species”)
SEM	: Ortalamanın standart hatası (“Standard error of the mean”)
TBARS	: “Thiobarbituric acid reactive substances”
TNF-α	: “Tumor Necrosis Factor-Alpha”
WB	: Western blot

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ROSMARİNİK ASİDİN İZOFLURANA BAĞLI APOPTOZ VE KOGNİTİF DİSFONKSİYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Serdar DEMİRGAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR

Potansiyel anestezi (özellikle inhalasyon anestezi) nörotoksitesitesi, uzun yıllardır pediatrik anestezinin tartışılan konularından olmuştur. Bu tez çalışması, pediatrik anestezi pratiğinde sıklıkla kullanılan izofluran (İZO) toksisitesine karşı, anestezi öncesi verilecek antioksidan özellikli doğal bir ajan desteği ile güvenli anestezi uygulamasını sağlamayı amaçlamıştır. Nörokoruyucu işlev de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitesi tanımlanan rosmarinik asitin (RA), anestezi ve anestezi maddeleri ile ilişkili nörodejenerasyon ve kognitif disfonksiyon üzerine etkisi belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada gelişen rat beyinde İZO toksisitesine bağlı oluşan nörodejenerasyonda ve kognitif disfonksiyonda, RA'nın koruyucu etkisi araştırıldı.

Bu tez kapsamında, etik izin alındıktan sonra (pilot çalışma da dahil olmak üzere) 84 adet Wistar albino rat yavrusu çalışmaya dahil edildi. Doğum sonrası gün (P)7 sıçan yavrusları rastgele dört gruba ayrıldı (n=20/grup): (1) Anestezi uygulanmayan, O₂ uygulanan (3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı) KONTROL grubu, (2) Anestezi uygulanan (3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran) İZO grubu, (3) İZO'dan önce RA (25mg/kg) alan RA+İZO deney grubu, (4) O₂'den önce RA (25mg/kg) alan RA ajan kontrol grubu. Uygulamalar P7, P9 ve P11 günlerinde yapıldı. Anesteziden bir saat önce intranasal olarak uygulanan RA'nın tekrarlı anesteziye karşı koruyucu etkisi; davranış testleri (n=10/grup),

histopatolojik analiz (n=5/grup) ve protein ekspresyon seviyeleri (n=5/grup) değerlendirilerek araştırıldı.

Çalışmanın birinci basamağı kognitif testleri içermektedir. Ratların öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını değerlendirmek için Morris su labirenti ("Morris Water Maze", MWM) deneyleri yapıldı. Öğrenme aşaması P28-32 günlerinde gerçekleştirilmiş olup, beş deneme günü boyunca ratların öğrenme yeteneği test edildi. Hafıza testi üç aşamada gerçekleştirildi: P33'te erken-aşama etkisi, P60'ta orta-aşama etkisi ve P90'da geç-aşama etkisi.

Çalışmanın ikinci basamağında ise, izofluranın rat beyinde oluşturduğu hasarı tespit etmek için beyin öğrenme ve hafıza merkezi olan hipokampus bölgesinde histopatolojik analizlere ek olarak western blot (WB) yöntemiyle protein ekspresyon seviyeleri çalışıldı. Histopatolojik değerlendirme için, hipokampus CA1 bölgesindeki apoptotik hücreler hematoksil-eozin (HE) boyama ile gösterildi ve aktif-kaspaz-3 miktarı immünohistokimyasal boyama (IHC) ile incelendi. Hipokampus beyin bölgesinden yapılan protein izolasyonu sonrasında yapılan WB deneylerinde ise apoptoz (Bax, Bcl-2, aktif kaspaz-3 fragmentleri p19 ve p17, kesilmiş PARP1 fragmenti p89), oksidatif stres (SOD1, GPX1, 4HNE), inflamasyon (NF- κ B p65, TNF- α) ve hücrel stres yanıtları (14-3-3 proteinleri, HSF1, Hsp90, Hsp70, Hsp60) değerlendirildi.

MWM test sonuçlarına göre, tüm gruplardaki ratların platformun yerini öğrendiği, fakat İZO grubundaki ratların daha zor öğrendiği görüldü. Hafıza testleri, anestezinin erken, orta ve geç hafıza üzerindeki hasar verici etkisini net bir şekilde ortaya koydu. İZO uygulanan ratların hedef kadranda daha az bulunduğu ve eski platform yerinden daha az geçtiği belirlendi. Buna karşılık anestezi öncesi RA uygulaması İZO-indüklü kognitif disfonksiyona karşı koruma sağladı. Histopatolojik ve WB analizleri de bilişsel yanıtları destekledi. HE ve IHC analizleri RA ön terapisinin yeni doğan beyninin hipokampus CA1 bölgesi nöronlarını, İZO-indüklü apoptoza karşı koruduğunu gösterdi. Moleküler analizler İZO-indüklü toksisiteye apoptotik, oksidatif ve inflamatuvar yanıtların dahil olduğunu ortaya çıkardı. Dikkat çekici olarak, İZO'ya bağlı olarak Hsp70 seviyelerinde artış, p-HSF1, Hsp90 ve Hsp60 seviyelerinde ise bir azalma görüldü. RA uygulaması, İZO kaynaklı artan Hsp70 seviyelerini azaltırken, azalan Hsp90 ve p-HSF1 seviyelerini ise arttırdı. Ayrıca, 14-3-3 β , γ , ϵ , ζ ve σ protein seviyeleri İZO grubunda önemli ölçüde azalırken, anesteziden önce RA uygulaması bu 14-3-3 izoformlarındaki azalmayı önledi. Sonuç olarak, İZO maruziyetinden bir saat önce uygulanan intranazal RA, gelişmekte olan sıçan beyindeki hipokampal nöronları apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyabilir ve mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarını azaltabilir. Bulgularımız, RA ön tedavisinin pediatrik pratikte genel anestezinin yan etkilerine karşı yeni bir terapötik yaklaşım sağlayabileceğini göstermektedir.

Şubat 2025, 108 sayfa.

Anahtar kelimeler: Pediatrik anestezi, izofluran (İZO) kaynaklı nörotoksisite, öğrenme ve hafıza eksiklikleri, rosmarinik asit ön tedavisi, intranazal uygulama, nöroprotektif etkiler.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EFFECTS OF ROSMARINIC ACID ON ISOFLURANE-INDUCED APOPTOSIS AND COGNITIVE DYSFUNCTION

Serdar DEMİRGAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR

Potential anesthetic (especially inhalational anesthetics) neurotoxicity has been a controversial issue in pediatric anesthesia for many years. This thesis aimed to provide safe anesthesia application against isoflurane (ISO) toxicity, which is frequently used in pediatric anesthesia practice, by giving a natural agent with antioxidant properties before anesthesia. The effect of rosmarinic acid (RA), described with a wide range of biological activities, including neuroprotective function, on anesthesia and neurodegeneration-cognitive dysfunction associated with anesthetic agents remains unclear. In this study, the protective effect of RA on neurodegeneration and cognitive dysfunction caused by ISO toxicity in the developing rat brain was investigated.

In this thesis, 84 Wistar albino rat pups (including the pilot study) were included in the study after ethical permission was obtained. Postnatal day (P)7 rat pups were randomly divided into four groups (n=20/group): (1) CONTROL group, which was not anesthetized and received O₂ (air mixture containing 30% oxygen for 3 hours), (2) ISO group, which was anesthetized (1.5% isoflurane in air mixture containing 30% oxygen for 3 hours), (3) RA+ISO experimental group, which received RA (25mg/kg) before ISO, (4) RA agent control group, which received RA (25mg/kg) before O₂. Applications were made on days P7, P9 and P11. The protective effect of RA administered intranasally one hour before anesthesia against repeated anesthesia was

investigated by evaluating behavioral tests (n=10/group), histopathological analysis (n=5/group), and protein expression levels (n=5/group).

The first stage of the study included cognitive tests. Morris Water Maze (MWM) experiments were conducted to evaluate rats' learning and memory functions. The learning phase was performed on days P28-32, and rats' learning ability was tested over five trial days. Memory testing was conducted in three stages: the early-stage effect at P33, the middle-stage effect at P60, and the late-stage effect at P90.

In the second step of the study, to determine the damage caused by isoflurane in the rat brain, in addition to histopathological analyses, protein expression levels were studied by western blot (WB) method in the hippocampus region, which is the learning and memory center of the brain. For histopathological evaluation, apoptotic cells in the hippocampus CA1 region were shown by hematoxylin-eosin (HE) staining and the amount of active-caspase-3 was revealed by immunohistochemical staining (IHC). In WB experiments conducted after protein isolation from the hippocampus brain region, apoptosis (Bax, Bcl-2, active caspase-3 fragments p19 and p17, cleaved PARP1 fragment p89), oxidative stress (SOD1, GPX1, 4HNE), inflammation (NF- κ B p65, TNF- α) and cellular stress responses (14-3-3 proteins, HSF1, Hsp90, Hsp70, Hsp60) were evaluated.

According to the MWM test results, rats in all groups learned the platform's location, but rats in the ISO group learned it with more difficulty. Memory tests clearly revealed the damaging effect of anesthesia on early, middle, and late memory. It was determined that rats administered ISO were less in the target quadrant and passed less through the old platform location. In contrast, pre-anesthesia RA administration protected against ISO-induced cognitive dysfunction. Histopathological and WB analyses also supported cognitive responses. HE and IHC analyses showed that RA pre-treatment protected neurons in the hippocampus CA1 region of the newborn brain against ISO-induced apoptosis. Molecular analyses revealed that apoptotic, oxidative, and inflammatory responses were involved in ISO-induced toxicity. Strikingly, an increase in Hsp70 levels and a decrease in p-HSF1, Hsp90, and Hsp60 levels were observed due to ISO. While RA application reduced the ISO-induced increased Hsp70 levels, it increased the decreased Hsp90 and p-HSF1 levels. Besides, 14-3-3 β , γ , ϵ , ζ , and σ protein levels were significantly reduced in the ISO group, while RA administration before anesthesia prevented the decrease in these 14-3-3 isoforms. Consequently, intranasal RA administered one hour before ISO exposure may protect hippocampal neurons in the developing rat brain against apoptosis, oxidative stress, and inflammation and reduce spatial learning and memory impairments. Our findings indicate that RA pre-treatment may provide a new therapeutic approach to the side effects of general anesthesia in pediatric practice.

February 2025, 108 pages.

Keywords: Pediatric anesthesia, isoflurane (ISO)-induced neurotoxicity, learning and memory deficits, rosmarinic acid pretreatment, intranasal administration, neuroprotective effects.

1. GİRİŞ

Anesteziyolojide son birkaç dekattır hasta güvenliği açısından büyük ilerlemeler olmuştur. Bu gelişmeler sayesinde mortalite değeri yaklaşık 1:2500'den 1:13000'lere kadar düşmüştür. Özellikle, pediatrik yaş grubundaki hastalar erişkinlere göre sahip oldukları farklı fizyolojik özellikler nedeniyle daha yüksek anestezi riski altındadır. Son yıllarda anestezinin çocuklarda nörogelişimsel süreç üzerine potansiyel etkilerine ilişkin endişeler artmaktadır (Gaba, 2000; Rosenthal, 2004; Modell, 2005). Öte yandan pediatrik tıbbi müdahalelerde anestezinin vazgeçilmez bir rol oynadığı da unutulmamalıdır. Bu bağlamda, anestezi uygulamalarının toksisitesini azaltarak güvenli uygulama prosedürlerini geliştirmek hem araştırmacıların hem de klinisyenlerin ortak hedefi haline gelmiştir.

Potansiyel anesteziik nörotoksitesisi, uzun yıllardır pediatrik anestezinin tartışılan konularından olmuştur. FDA ("The U.S. Food and Drug Administration") 3 yaşından küçük çocukların üç saatten uzun süreli veya tekrarlayan anestezi uygulamaları sonrası davranış değişiklikleriyle birlikte öğrenme ve hafıza üzerine kognitif bozukluk riski ile karşı karşıya olduklarını bildirmiştir (FDA, 2017). Bunun üzerine, GAS ("General Anesthesia Spinal") ve PANDA ("Pediatric Anesthesia Neurodevelopmental Assessment") adı verilen iki büyük çalışma yürütülmüş ve ortak sonuç olarak tek sefer anestezi uygulamasının pediatrik grupta nörokognitif disfonksiyon açısından risk oluşturmadığı bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2016; McCann ve diğ., 2019). Bu tez projesi konusu da ilgilendiren asıl ilginç sonuçlar MASK ("Mayo Anesthesia Safety in Kids") çalışmasından elde edilmiş ve tekrarlayan anestezi uygulamasının çocuklarda öğrenme ve davranışlarla ilişkili problemlere neden olduğu raporlanmıştır (Warner ve diğ., 2018). Pediatrik anestezi uygulamalarının gelişen beyin ve kognitif fonksiyonlar üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar daha çok rodentler üzerinde yapılan deneysel çalışmalardan oluşmaktadır (Steckler ve Muir, 1996; Tayebati, 2006). Biz de bu doktora tez çalışması kapsamında gerçekleştirdiğimiz bir pilot çalışma ile Wistar albino rat (sıçan) yavrularında tek sefer anestezi uygulamasına karşı tekrarlı anestezi maruziyetinin ciddi toksik etkisinin olduğunu gösterdik. Bu nedenle, anestezi kaynaklı toksisite ve hasar modeli için doğum sonrası 7, 9 ve 11. günlerde ("postnatal days 7, 9, 11; P7+9+11") anestezi uygulamasını gerçekleştirdik.

Anestezinin gelişen beyin üzerine etkisini inceleyen çalışmalar daha çok inhalasyon anestezikleri ile yapılmıştır. Anestezi ile ilişkili kognitif disfonksiyon ile en fazla ilişkilendirilen ajanlar da yine inhalasyon anestezikleridir. Sevofluran, desfluran ve izofluran günlük anestezi pratiğinde en sık kullanılan inhalasyon anestezikleridir. Bunlar içinde en çok öne çıkan izofluran anesteziğidir. Bu bilgiden hareketle, klinik açıdan daha anlamlı veriler elde etmek amacıyla bu tez çalışmasında da izofluran anesteziği kullanıldı (Pradeep ve diğ., 2017; Eshetie ve diğ., 2020). Bu doğrultuda, P7+9+11'de rat yavrularına 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran (İZO) anestezisi uygulanmıştır.

Bu doktora tez çalışması, pediatrik anestezi pratiğinde izofluran toksisitesine karşı, anestezi öncesi verilecek antioksidan özellikli doğal bir ajan desteği ile güvenli anestezi uygulamasını sağlamayı amaçlamıştır. Literatürdeki önceki raporlarımız (Demirgan ve diğ., 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ve diğer araştırmacıların çalışmaları (Golomazou ve diğ., 2016; Hassan ve diğ., 2019) çok çeşitli doğal bileşiklerin anesteziye karşı koruyucu etkilerini araştırmıştır, fakat alternatif tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir bitki olan biberiye'nin (*Rosmarinus officinalis*) ana bileşenlerden biri olan rosmarinik asitin (Noor ve diğ., 2022) anestezi ve anestezik maddeler ile ilişkili nörodejenerasyon ve kognitif disfonksiyon üzerine etkisini değerlendiren herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu doktora tez çalışmasında, izoflurana bağlı oluşan nörodejenerasyonda ve kognitif disfonksiyonda, rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Öncelikle RA dozunu belirlemek üzere bir pilot çalışma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde her anestezi uygulamasından 1 saat önce intranazal yoldan 25 mg/kg olacak şekilde RA, rat yavrularına uygulanmıştır.

Bu bilgiler ışığında tasarlanan bu tez projesinde etik kurul izinleri kapsamında 4 ana grup mevcuttur. **(1) KONTROL** grubundaki ratlara P7+9+11'de 3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı uygulanmıştır. **(2) İZO** grubundaki ratlara P7+9+11'de 3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran (İZO) anestezisi uygulanmıştır. **(3) RA+İZO** grubundaki ratlara P7+9+11'de 3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran (İZO) anestezisi uygulamasından 1 saat önce intranazal yoldan rosmarinik asit (RA) verilmiştir. **(4) RA** grubundaki ratlara ise P7+9+11'de 3 saat 30% oksijen içeren hava karışımı uygulamasından 1 saat önce intranazal yoldan RA verilmiştir.

Çalışmanın birinci basamağı ratlar ile yapılan kognitif testleri içermektedir. Ratların öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını değerlendirmek için Morris su labirenti ("Morris Water Maze",

MWM) deneyleri yapılmıştır. Öğrenme aşaması P28-32 günlerinde gerçekleştirilmiş olup, beş deneme günü boyunca ratların öğrenme yeteneği test edilmiştir. Bunun için ratların platformu buluş süreleri, hızları ve yüzme profilleri analiz edilmiştir. Hafızanın test edilmesi ise üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Erken aşamadaki etki P33'te, orta aşamadaki etki P60'ta ve geç aşamadaki etki ise P90'da test edilmiştir. Bu aşamada havuzdaki platform kaldırılmıştır ve öğrenme aşamasındaki eski platform alanından geçiş sayısı, hedef kadrın olarak adlandırılan bölgede geçirilen süre, hız ve yüzme profilleri değerlendirilmiştir. Ayrıca hem öğrenme hem de hafıza fazlarında havuz kenarına 10 cm yakınlıktaki bölgede geçirilen zamanın yüzdesi hesaplanarak tigmotaksis (Higaki ve diğ., 2018) değerlendirilmiş ve anesteziye bağlı anksiyete hakkında fikir sahibi olunmuştur.

Çalışmanın ikinci basamağında ise; izofluranın rat beyinde oluşturduğu hasarı tespit etmek amacıyla beyin öğrenme ve hafıza merkezi olan hipokampus bölgesinde histopatolojik analizlere ek olarak western blot (WB) yöntemiyle protein ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirme için, öğrenme ve hafıza merkezi olan hipokampus CA1 bölgesindeki apoptotik hücreler Hematoksilen-Eozin (HE) boyama ile gösterilmiş ve aktif-kaspaz-3 miktarı immünohistokimyasal boyama (IHC) ile ortaya konmuştur. Hipokampus beyin bölgesinden yapılan protein izolasyonu sonrasında yürütülen WB deneylerinde ise apoptoz (Bax, Bcl-2, aktif kaspaz-3 fragmentleri p19 ve p17, kesilmiş PARP1 fragmenti p89), oksidatif stres (SOD1, GPX1, 4HNE), inflamasyon (NF- κ B p65, TNF- α) ve hücresel stres yanıtları (14-3-3 proteinleri, HSF1, Hsp90, Hsp70, Hsp60) değerlendirilmiştir. Bu analizler, izofluran ile ilişkili nörodejenerasyonda; apoptotik, oksidatif ve inflamatuvar yanıtlar ile ısı şoku proteinleri ("Heat shock protein" Hsp) arasındaki olası ilişki hakkında bilgi sahibi olmak ve bu mekanizmalar arasındaki etkileşimi ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Literatürdeki bilgiler anestezi indüklü toksisiteye artan reaktif oksijen türlerine ("reactive oxygen species", ROS) bağlı olarak oksidatif hasar, inflamatuvar yanıt ve neticede apoptotik yanıtların dahil olduğunu vurgulamaktadır (Zhang ve diğ., 2010; Senoner ve diğ., 2021; Ritiu ve diğ., 2022). Ek olarak stres proteinlerinin ekspresyonlarını kontrol eden transkripsiyon faktörü HSF1 ("heat shock factor 1") ve protein homeostazından sorumlu Hsp90, Hsp70 ve Hsp60 seviyelerinin anestezi uygulamalarından nasıl etkilendiğine dair bilgiler oldukça kısıtlıdır; az sayıda çalışmada koruyucu rollerine işaret etmiştir (McClintick ve diğ., 2011; Vizcaychipi ve diğ., 2011). Beyin gelişimi ve bilişsel süreçlerdeki rollerine ait bilgiler literatürde mevcut olmakla birlikte (Cornell ve Toyo-Oka, 2017) anestezi kaynaklı

hasara karşı verdikleri cevap belirsiz olan diğer önemli stres protein ailesi üyeleri ise 14-3-3 proteinleridir. Bu proteinlerin seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi hem anestezi kaynaklı hasar mekanizması hem de RA'nın koruyucu olarak işlevinde görev olan hücresel elemanlar hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak, İZO anestezisi öncesi verilen antioksidan bir ajan desteği olarak rosmarinik asit uygulaması ile güvenli anestezi uygulamasının sağlanması amaçlanmıştır. MWM test sonuçlarına göre, tüm gruptaki ratların platformun yerini öğrendiği fakat İZO grubundaki ratların daha zor öğrendiği belirlenmiştir. Hafıza testleri, erken, orta ve geç hafıza üzerinde anestezinin hasar verici etkisini net bir şekilde göstermiştir. İZO uygulanan ratların hedef kadranda daha az bulunduğu ve eski platform yerinden daha az geçtiği belirlenmiştir. Buna karşı anestezi öncesi RA uygulaması İZO-indüklü kognitif disfonksiyona karşı koruyucu etki sağlamış ve hafıza testlerinde KONTROL grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca gruplar arasında ratların yüzme hızlarında fark görülmemesi, motor fonksiyonların etkilenmediğini ve İZO kaynaklı hasarın, öğrenme ve hafıza kabiliyetleri üzerinden olduğunu desteklemiştir.

Histopatolojik analizler bilişsel yanıtları desteklemiştir. İZO grubundaki ratların hipokampus beyin bölümünün CA1 bölgesindeki nöronlarda hücre büzülmesi, hücre-hücre temasının kaybı, piknotik nükleus, sitoplazmik yoğunlaşma ve birçok boş vezikül belirlenmiş ve aktif-kaspaz-3 seviyelerinde de artış tespit edilmiştir. HE ve IHC analizleri, RA ön terapisinin İZO-indüklü apoptoza karşı koruyucu olduğunu göstermiştir.

Moleküler analizler İZO-indüklü toksisiteye apoptotik, oksidatif ve inflamatuvar yanıtların dahil olduğunu gösterirken RA'nın bu hasar verici etkiye karşı koruyucu işlev sergilediğini göstermiştir. Hücresel stres yanıtlarında kilit elemanlar olan stres proteinlerinin ekspresyon profilleri incelendiğinde ise İZO'ya bağlı olarak Hsp70 seviyelerinde artış, p-HSF1, Hsp90 ve Hsp60 seviyelerinde ise bir azalma görülmüştür. RA uygulamasının, İZO kaynaklı artan Hsp70 seviyelerini azalttığı ve azalan Hsp90 ve p-HSF1 seviyelerini ise arttırdığı belirlenmiştir. Ek olarak, İZO grubunda 14-3-3 β , γ , ϵ , ζ ve σ protein seviyelerinin önemli seviyelerde azaldığı görülürken, anestezi öncesi RA uygulamalarının bu 14-3-3 izoformlarındaki azalmayı önlediği tespit edilmiştir.

Sonuçları genel olarak ele aldığımızda, İZO maruziyetinden bir saat önce intranasal yolla RA uygulamasının, gelişmekte olan sıçan beyninin hipokampal nöronlarını apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruduğu ve mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarını azalttığı görülmektedir. Bu tez projesi, anesteziden önce rosmarinik asitin burun deliğinden uygulanmasının, ajanın kan beyin bariyeri engeline takılmadan beyine kolay ulaşımını sağlayabileceğini ve bu yolla da gelişmekte olan beyindeki postoperatif bilişsel eksiklik riskini önlemek için etkili bir strateji olabileceğini ileri sürmektedir. Bulgularımız, RA uygulamasının pediatrik pratikte genel anestezi uygulamalarının yan etkileri için yeni bir terapötik yaklaşım sağlayabileceğini göstermektedir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. GENEL ANESTEZİ

İlk defa M.S. 1. yüzyılda adamotu bitkisinin narkotik benzeri etkilerini tanımlamak için Yunan filozof Dioscorides tarafından anestezi terimi kullanılmıştır. 1846 yılında Oliver Wendell Holmes ağrısız cerrahide amnezi, analjezi ve narkoz durumlarını betimlemek için “anestezi” teriminin kullanılmasını öneren ilk kişi olmuştur (Butterworth ve diğ., 2013). Genel anestezi, bir operasyon veya ameliyat sırasında hayati fonksiyonlarda değişim olmamakla birlikte geçici olarak bilinç kaybı ve reflekslerde düşüş ile karakterize edilir (Kayhan, 2019). Eski zamanlarda, fizik muayene ile hastanın anestezi derinliğine ilişkin bilgi edinilmekteydi. Fakat yeterli tecrübeye sahip olmayan bir anestezi uzmanı tarafından aşırı dozda anestezi ajan uygulanması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Önemli olarak, 20. yüzyıla kadar anestezi camiasında, hasta izlemi üzerine sistematik bir yaklaşım geliştirilememiştir. Dr. Arthur Guedel, 1937 yılında 1. aşamadan 4. aşamaya kadar giderek artan ve anestezi derinliğini açıklayan “anestezinin aşamaları” üzerine bir sınıflandırma oluşturmuştur (Keys, 1975).

Guedel sınıflandırmasına göre anestezinin aşamaları:

- 1. aşama: Analjezi ve dezoryantasyon
- 2. aşama: Eksitasyon ve deliryum
- 3. aşama: Cerrahi anestezi
- 4. aşama: Derin anestezi (aşırı doz)

Genel anestezide kullanılan ajanlar bilinç kaybını retiküler formasyon (omurilik, beyincik ve serebral korteks arasında bağlantı kuran karmaşık bir nöron ağı) işlevini bloklayarak sağlarlar, ağrıya karşı yanıt oluşumunu engellerler ve hareketsiz kalmayı ise spinal kord inhibisyonu ile sağlarlar. Oluşan bilinç kaybı, reflekslerin baskılanması ve kas gevşemesi **genel anestezi triadı** olarak adlandırılır (Kayhan, 2019).

Genel anestezi vücutta birçok fizyolojik değişime sebep olur ve doğru bir şekilde gerçekleştirilmediğinde potansiyel olarak morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilir. Bu yüzden

operasyonun faydalarının, potansiyel zararlarından daha fazla olan işlemler kabul edilmelidir. Anestezi ile ilişkili ölüm sıklıkla gastrik içeriğin akciğerlere aspirasyonu, asfiksi (oksijen yetersizliğinden ileri gelen boğulma) veya anafilaksi (ölümle sonuçlanabilen, aniden başlayan ciddi alerjik reaksiyon) nedeniyle gerçekleşmektedir (Albin ve Nikodemski, 2018). Fakat son yıllarda anestezi ve monitörizasyon yöntemlerinde meydana gelen gelişmeler ve anestezi uygulamasının deneyimli anestezi uygulayıcıları tarafından gerçekleştirilmesi gibi faktörler, bugün anestezinin yeterince etkili ve güvenli bir yöntem olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Stiegler ve Ruskin, 2012).

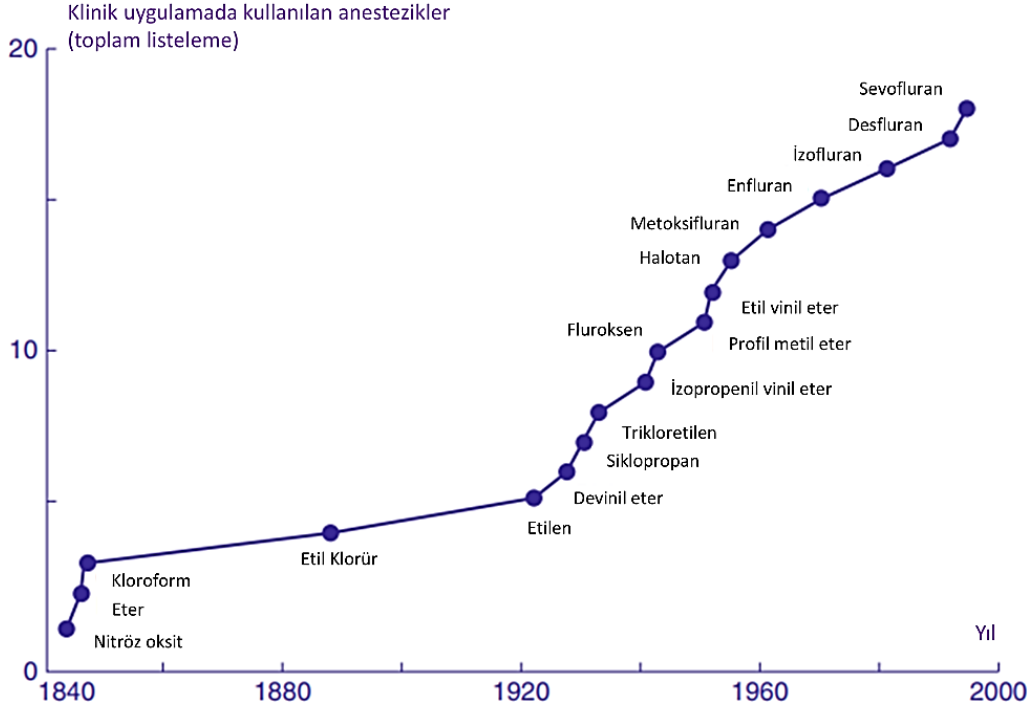
Genel anestezi üç temel basamaktan oluşur: (1) indüksiyon, (2) idame ve (3) uyanma. İndüksiyon basamağı ameliyat öncesi hastaya ilaç verilmesi ve etkilerinin hissedilmeye başladığı, fakat bilincin kapanmadığı süreçtir. Hasta sakinleşmiştir, bu süreçte konuşabilir ve nefes alması yavaş ve düzenlidir. Bu aşamada hasta, amnezi içeren analjeziye doğru ilerler ve bilinç kaybıyla indüksiyon sonlanır (Winterberg ve diğ., 2018). İdame basamağında ana hedefler; organ fonksiyonlarını korumak, yaralanmayı önlemek ve anestezinin sürekliliğini sağlamaktır. Bu basamakta inhalasyon veya intravenöz anestezi ajanları birlikte kullanılabilir. Anestezi derinliğinin etkili bir şekilde manipüle edilmesi için seçilecek ajanın fizyokimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi gereklidir (Angelov ve Iohom, 2023). Son basamak olan uyanma evresi ise, verilen anestezi ajan(lar)a ve miktar(lar)ına bağlı olarak gerçekleşen pasif bir süreçtir. Uyanma evresini etkileyen faktörler ilaçların verilme noktası, cerrahi işlemleri süresi ve tipi, ayrıca anestezi ajanının farmakokinetik özelliğidir. İlk klinik bulgu bu aşama için nöromuskülerde kalkan blokaja bağlı olarak kendiliğinden solunuma geçilmesidir. Hastaların dinlenme alanına alınmadan önce sorulan basit sorulara cevap vermesi, temel motor fonksiyonlarının tekrardan eski hale gelmesi ve ağrı hissedilebilmesi beklenir (Cascella ve diğ., 2020).

Anestezi ajanlarının vücuda verilmesi genel olarak iki yolla olmaktadır: (1) damar (intravenöz) ve (2) solunum (inhalasyon) yolu. Fakat az da olsa nazal, intramusküler, subkutan, oral veya rektal şekilde de anestezi uygulaması yapılmaktadır. Genel anestezide, intravenöz uygulama için ketamin, deksmedetomidin, tiyopental, propofol, midazolam ve etomidat; inhalasyon uygulaması için izofluran, nitroz oksit, desfluran, sevofluran, xenon (xenon) gibi anestezi ilaçları kullanılmaktadır (Murphy ve diğ., 2012).

Genel anestezikler, intravenöz ya da inhalasyon yoluyla uygulaması sonrası dolaşım ile bütün bedene dağılır, fakat merkezi sinir sisteminde (“Central Nervous System”, CNS) en yüksek etkiyi gösterirler. Beyinde ise en çok etkilenen alanlar hipokampus, serebellum, frontal korteks ve parietal kortektir (Butterworth ve diğ., 2013). Her ne kadar CNS’de etkisi çok fazla olsa da anestezinin derinliği ve durumu, intrakraniyal kaynaklı etkilere göre ölçülen minimum alveolar konsantrasyon (“minimum alveolar concentration”, MAC) ile değerlendirilir (Pavel ve diğ., 2020). CNS’de, genel anestezi ajanlar inhibitör nörotransmisyonunu artırıp, uyarıcı nörotransmisyonu azaltarak geniş bir etki üretirler. İnhibitör nörotransmitterlere örnek olarak GABA ve glisin verilebilir; işlevleri hiperpolarizasyon veya indükleyici sinyalleri yönlendirerek postsinaptik aktiviteyi azaltmaktır. Depolarizasyonu sağlayan uyarıcı nörotransmitterlere örnek olarak ise glutamat ve asetilkolin verilebilir. Anestezi maddelerin fizyolojik etkileri ve meydana getirdiği çeşitli davranışsal yanıt biçimleri, iyonotropik taşıyıcı reseptörler üzerinde etkili olan nöronal uyarılabilirlik etkileriyle yakından bağlantılıdır. Genel anesteziklerin başlıca moleküler hedefleri arasında, GABA_A, glisin, nikotinik kolinerjik ve N-metil-D-aspartat (NMDA) alt tipi glutamat reseptörleri bulunur. Potasyum ve sodyum kanalları da genel anesteziğe karşı duyarlıdır. Bunlar arasında, en dikkat çeken ise GABA_A reseptörleridir (Diao ve diğ., 2014).

2.1.1. İnhalasyon Anesteziklerinin Tarihçesi

İnhalasyon anesteziklerinin tarihçesi, William Morton'un 1846'da eter kullanarak cerrahi anestezinin ilk halka açık gösterisine dayanır (Butterworth ve diğ., 2013). Fakat insanlar bilinç azalmasına neden olan afyon gibi uyarıcıları 3000 yıldan uzun süredir kullanmaktadır. 13. yüzyılda yaşamış rahip ve cerrah olan Theodoric farklı bitkilerden (afyon, hiyosiyamin, balıran otu, dut, adamotu, odunsu sarmaşık) oluşan dengeli bir anestezi geliştirmiş ve alkol veya alkolsüz olarak işlem sırasında bir sünger yardımıyla ve solunum yoluyla vermiştir (Frost, 2014). 1844'te bir diş hekimi olan Wells, azot protoksiti (N₂O) solunum yoluyla vererek ağrısız diş çekimi yapmıştır (Archer ve Wells, 1960). 1847'de ise Dr. Simpson ilk kez kloroformu (CHCl₃) anestezi olarak kullanmıştır (Simpson, 1848). Anestezi özelliği bulunan ajanların birçoğu toksisite veya yanıcılık nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır. Klinik uygulamada kullanılan inhalasyon anestezikleri ve bunların kullanıma sunulma zamanları Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Frost, 2014).

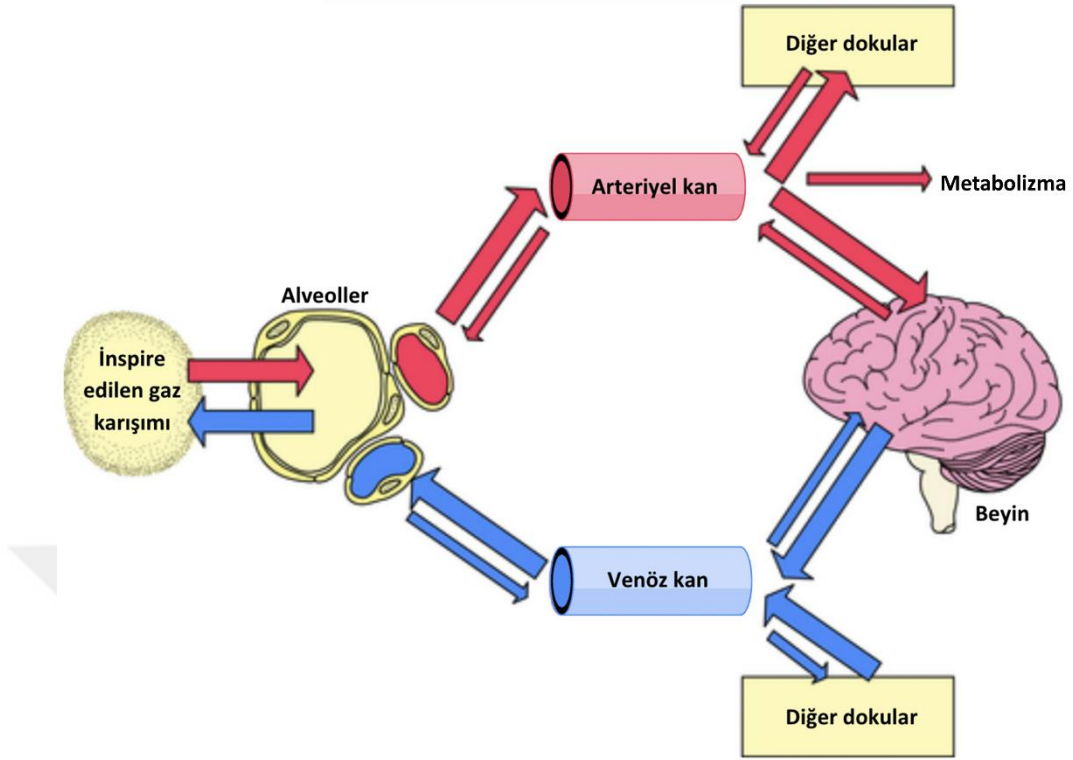


Şekil 2.1: 1840-2000 yılları arasında piyasaya sürülen anestezi ajanları (Frost, 2014).

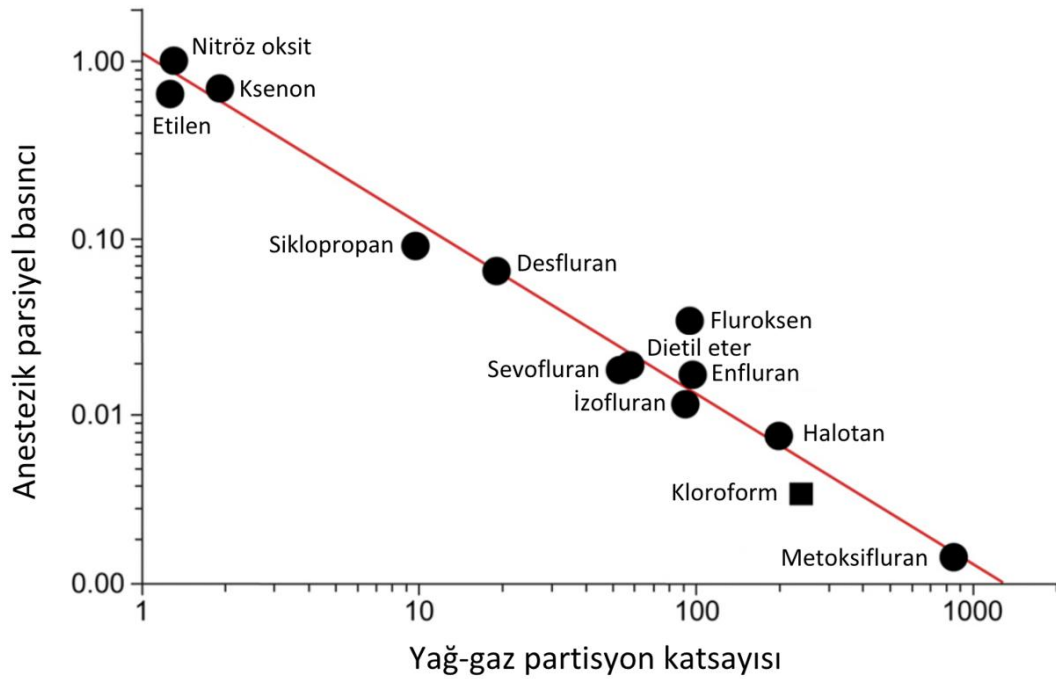
2.1.2. İnhalasyon Anesteziklerinin Etki Mekanizması

İnhalasyon anesteziklerinin etki mekanizmalarının nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bunun nedeni tek molekül veya yolak üzerinden etkisini gösteren intravenöz anesteziklerine göre, solunum yolu ile alınan inhalasyon anesteziklerinin birden fazla bölgeye etki göstermesidir (Frost, 2014). İnhalasyon anestezikleri ilk olarak alveollere daha sonra kana geçerek beyin dokusuna nüfuz ederler (Şekil 2.2) (Kayhan, 2019).

Harless ve von Bibra (1847) eterin beyin hücrelerdeki yağı çözerek etki ettiğini söylemiştir. Benzer şekilde Meyer 1899 yılında yaptığı çalışmada anestezinin gücünün lipid çözünürlüğü ile alakalı olduğunu öne sürmüştür. Overton ise 1901 yılında Meyer'inkine benzer bir hipotez sunmuştur ve bu hipotez Meyer-Overton teorisi olarak benimsenmiştir. Bu teori, inhalasyon anesteziklerinin etkinliğinin lipid çözünürlüğüne bağlı olduğunu ve asıl anestezik etkinin spesifik olarak inhalasyon anesteziklerinin değil, çözülmüş molekül miktarına bağlı olduğunu anlatmaktadır (Şekil 2.3). Bu teorem kullanılan ajanların nöronlardaki çift bariyerli lipid yapıyı kritik bir seviyede çözerek işlev bozukluğuna neden olduğuna ortaya koymaktadır (Kopp ve diğ., 2009).

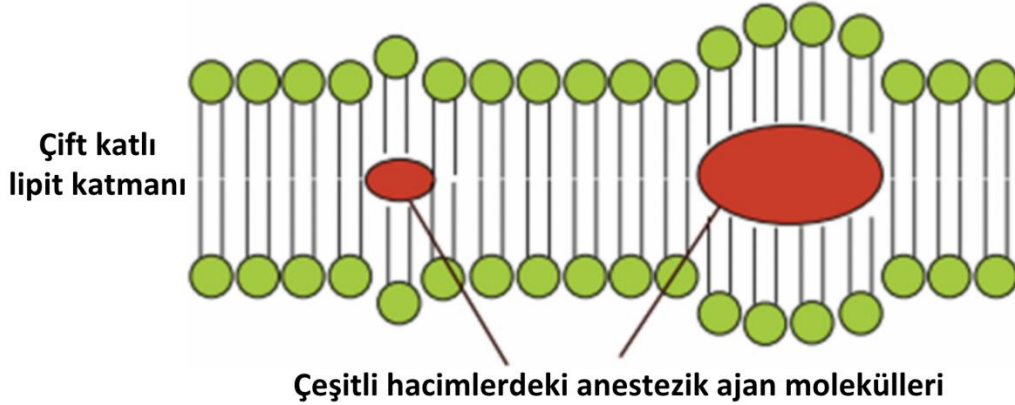


Şekil 2.2: Anestezi indüksiyonu (kırmızı oklar) ve anesteziden çıkış (mavi oklar) sırasında inhalasyon anestezik ajanının etki yolu. Büyük oklar net hareketin yönünü gösterir. (Malik, 2021).



Şekil 2.3: Meyer-Overton korelasyonu (Kopp ve diğ., 2009).

Günümüze daha yakın bir tarihte ise, Miller ve diğ. (1973) yaptıkları çalışmada hidrofobik özellikteki inhalasyon anesteziklerinin, nöronların çift bariyerli lipid tabakasının arasında toplanarak, membran yapısında bozulmaya ve genişlemeye neden olduğu hipotezini ileri sürmüşlerdir. Genişleyen membran yapısından dolayı iyon kanallarının işlevinde bozulmaya ve nöronlarda geri dönüşümlü hasarlara neden olarak anesteziğin etkinin olabileceği ortaya konmuştur. Daha büyük moleküllere sahip anesteziğin maddelerin lipid çift tabakasının daha fazla genişlemesine ve bozulmasına neden olduğu gösterilmiş ve böylece anestetiğe bağlı lipid çift tabakası ekspansiyonu hipotezi ortaya çıkmıştır (Şekil 2.4) (Frost, 2014). Ancak lipid temelli bu teoriye ters sonuçlara sahip çalışmalar da rapor edilmiştir. İki farklı çalışma grubunun yaptığı çalışmalarda, artan anesteziğin ajan konsantrasyonlarına bağlı olarak çift tabakalı lipid membranda genişleme görülmemiştir. Lipid teoremine göre inhalasyon ajanlarına maruziyette MAC değeri sıcaklığın yükselmesine bağlı olarak azalırken, bu çalışma sonuçları tam tersi olarak MAC değerinin arttığını ortaya koymuştur (Simon ve diğ, 1979; Franks ve Lieb, 1987).



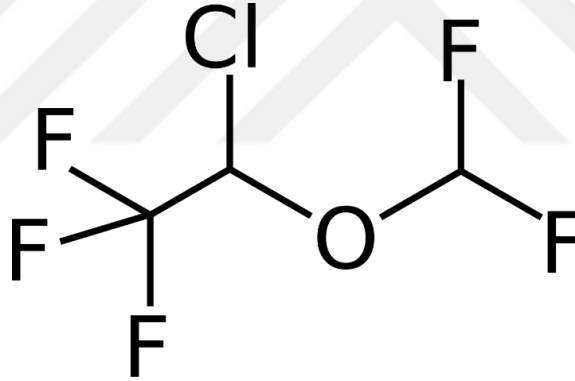
Şekil 2.4: Anestetiğe bağlı lipid çift tabakası ekspansiyonu hipotezi (Frost, 2014).

Lipit teorimi dışında, anesteziğin lipid/protein etkileşimi aracılığıyla anesteziğin etkilerinin ortaya çıktığını ileri süren çalışmalar da yapılmıştır. Franks ve Lieb (1984) tarafından yapılan bir çalışmada, anesteziğin ajanların spesifik reseptörlere bağlanmak için endojen ligandlarla rekabet ederek etki gösterdikleri ortaya koyulmuştur. Bu çalışma inhalasyon ilaçlarının çift katmalı lipid membranda bulunan hidrofobik protein bölgeleri ile spesifik olmayan etkileşimler kurabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda aslında anesteziğin ajanların, protein kinaz C ve iyon kanalları dahil olmak üzere sitoplazmada bulunan birçok sinyal

proteininin fonksiyonunda değişime neden olabileceği gösterilmiştir. GABA_A, GABA_C, glisin; Cys-loop reseptörleri ve uyarıcı reseptörleri olan asetilkolin ve 5-HT₃ serotonin anestezi ajanlarının hedefleridir (Eckenhoff ve Johansson, 1997).

2.2. İZOFLURAN ANESTEZİSİ ve NÖROKOGNİTİF BOZUKLUKLAR

Terrell tarafından 1965 yılında sentezlenen izofluran (İZO), klinikte 1984 yılından itibaren kullanıma girmiştir. 1-kloro-2,2,2-trifloretil diflor metil eter olan İZO'nun (Şekil 2.5) kokusu etere benzerdir, fakat yanıcı değildir. İZO halojen yapılu bir eterdir ve belli bir basınç ve ısı altında sıvı formdan vaporizatörle buharlaştırılarak kullanılmaktadır. MAC değeri %1.2'dir ve patisyon katsayıları; yağ/kan 45, kan/gaz 1.4, kas/kan 4.0 ve beyin/kan 2.6'dır. Kimyasal olarak stabil bir anesteziktir. Dünya çapında sıklıkla kullanılan inhalasyon ajanı olan İZO, keskin kokusu sebebiyle induksiyonda kullanılmazken, intraoperatif dönemde anestezi sağlamak için kullanılmaktadır (Butterworth ve diğ., 2013).



Şekil 2.5: İzofluranın kimyasal yapısı (Wade ve Stevens, 1981).

İZO merkezi sinir sisteminde bulunan N-metil-D-aspartat (NMDA), glisin ve GABA reseptörlerine bağlanarak nörotransmitter kapılı iyon kanallarının aktivitesini azaltır (Jones ve diğ., 1992; Brunson, 2008). Omurilikte bulunan NMDA tipi glutamat ve glisin reseptörlerini inhibe ederek iskelet kası gevşemesini sağlar (Hawkley ve diğ., 2020). İZO'nun kardiyak sistem sol ventrikülünde sınırlı etkileri tespit edilmiştir; bu etki doza bağlı olarak β-adrenerjik uyarım ile sistemik vasküler dirençte azalmaya ve kalp atışında hızlanmaya sebebiyet verebilmektedir (Butterworth ve diğ., 2013; Hawkley ve diğ., 2020). Ayrıca, İZO anestezisinden induksiyonla uyanma hızlı bir şekilde gerçekleşir (Tsukamoto ve diğ., 2016; Brunson, 2008).

Kognitif (bilişsel) fonksiyonlar çevreden alınan bilgilerin doğru şekilde tanımlanması, yorumlaması ve yönetilmesine imkân sağlayan zihinsel bir beceridir (Petersen, 2004). Uygun şekilde yerine getirilen kognitif fonksiyonlar, hem günlük yaşamda en temel işlerin yapılmasını hem de karmaşık aktivitelerin gerçekleştirilebilmesini sağlar. Birçok iç ve dış etken kognitif fonksiyonların azalmasına ve bozulmasına neden olabilir (DeCarli, 2003; Murman, 2015). Bu etkenlerden biri de beyin fonksiyonlarını olumsuz etkileyen anestezi maruziyetleridir. Özellikle erken yaşta anestezik maddelere maruz kalma, nörobilişsel işlev bozukluğu için önde gelen risk faktörlerinden biridir (Wilder ve diğ., 2009; Walters ve Paule, 2017; Feng ve diğ., 2020). Pediatrik anestezide potansiyel anestezik nörotoksitesitesi yıllardır tartışma konusu olmuştur. FDA (“the U.S. Food and Drug Administration”) tarafından yayınlanan bir bildiride 3 yaşından küçük çocukların, üç saatten uzun süreli veya tekrarlayan anestezi uygulamalarına maruz kalmaları sonucunda öğrenme-hafıza güçlüklerine eşlik eden, artmış davranış bozuklukları riski olduğu rapor edilmiştir (FDA, 2017). Bu bildiri, pediatrik hasta grubunda anestezi ile ilişkili potansiyel nörotoksitesitenin araştırıldığı ve birçok resmi ve özel kuruluş tarafından destekli çalışmanın yapılmasını tetiklemiştir. Bu çalışmalardan en önemli iki tanesi GAS (“General Anesthesia Spinal”) and PANDA (“Pediatric Anesthesia Neurodevelopmental Assessment”) araştırmalarıdır. GAS çalışmasında 2 yaşın altındaki çocuklara uygulanan 1 saatin altındaki genel anestezinin, spinal anestezi ile karşılaştırıldığında, nörogelişimsel açıdan olumsuz etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır (McCann ve diğ., 2019). Benzer şekilde, PANDA çalışmasında da tek sefer anestezi uygulamasının 3 yaş altı çocuklarda nörokognitif disfonksiyon açısından risk oluşturmadığı bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2016). Fakat MASK (“Mayo Anesthesia Safety in Kids”) çalışması, tekrarlayan anestezi uygulamasının, çocuklarda öğrenme ve davranışlarla ilişkili problemlere neden olduğunu göstermiştir (Warner ve diğ., 2018). Farklı retrospektif ve prospektif çalışmalar, 18 yaş altı anestezi alan çocuklarda öğrenme yetersizliği, dikkat eksikliği, davranışsal anormallikler gibi kognitif bozuklukların görülebileceğini rapor etmiştir (Arnold ve diğ., 1993; Hughes ve diğ., 1993; Kelsall ve diğ., 1994; McBeth ve Watkins, 1996; Sackey ve diğ., 2005; DiMaggio ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2014; Grabowski ve diğ., 2021). Büyük çaplı bir retrospektif çalışmada ise tekrarlayan genel anestezi uygulanan 4 yaş altı çocukların okuma, yazma yeteneklerinin ve matematik zekalarının genel anestezi almamış çocuklarla kıyaslandığında 2 kat daha fazla oranda olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Wilder ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde, anestezi ile ilişkili

nörokognitif bozuklukların tekrarlayan ve/veya uzamış anestezi ile ilişkili olduğu dile getirilmiştir (Grabowski ve diğ., 2021).

Pediyatrik anestezi uygulamalarının gelişen beyin ve kognitif fonksiyonlar üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, neonatal ratlarda tekrarlayan düşük doz propofol anestezisi sonrası nöro-apoptoz, nöro-inflamasyon ve kognitif disfonksiyon görülmezken; orta ve yüksek doz propofol anestezisinin beyinde pro-apoptotik faktörlerde (kaspaz-3, Bax), pro-inflamatuvar sitokinlerde (IL-1 β , IL-6, ve TNF- α) artışa ve bununla ilişkili olarak kognitif fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Han ve diğ., 2015). Farklı bir çalışmada, tibia fraktürü olan yaşlı farelerde ketamin uygulamasının TRPV4/AMPK/NF- κ B sinyal yolağını aktive ederek, anestezi ve cerrahiye bağlı kognitif disfonksiyonu engellediği bildirilmiştir (Li ve diğ., 2022). Neonatal ratlarda ketamin ile yapılan başka bir çalışmada ise dişi ratların beyinde aşırı myelinizasyona neden olduğu, fakat bu durumun ilerleyen zamanlarda kognisyonda bozulmaya neden olmadığı bulunmuştur. Ayrıca erkek ratlarda ketaminin tekrarlayan uygulamasının myelinizasyonda ve kognisyonda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (Zhang ve diğ., 2019).

Anestezinin gelişen beyin üzerine etkisi daha çok inhalasyon anestezikleri kullanılarak yapılmıştır. Bunun nedeni, anestezi ile ilişkili kognitif disfonksiyonların daha çok inhalasyon anesteziklerine bağlı olarak gelişmesidir. Günlük anestezi pratiğinde en sık kullanılan inhalasyon anestezikleri sevofluran, desfluran ve izoflurandır. Sevofluran pediatrik anestezide yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kısa ve uzun dönem nörolojik fonksiyonlar üzerine etkisi hala gizemini korumaktadır. Deneysel çalışmalar beyin gelişiminin hayati dönemlerinde uygulanan sevofluran anestezisinin, nöronal apoptozise ve nöro-kognitif yetersizliğe neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu olumsuz etkiler maruziyet süresi, frekansı ve maruziyet yaşı ile yakından ilişkilidir (Apai ve diğ., 2021). Birçok çalışma sevofluran ile ilişkili kognitif disfonksiyonda, nöro-inflamasyonun kilit rol oynadığını göstermiştir (Terrando ve diğ., 2011; Vacas ve diğ., 2013; Riedel ve diğ., 2014).

Sevoflurana ek olarak izofluran da pediatrik anestezide sıklıkla kullanılan bir inhalasyon anestezigidir. Her iki ajanın da anestezi uygulanmasının akut evrelerinde neonatal farelerin beyinlerinde nöro-apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Istaphanous ve diğ., 2011). İZO ile yapılan farklı bir çalışmada, fare beyininde sevoflurana göre daha fazla düzeyde apoptoza neden olduğu da gösterilmiştir (Liang ve diğ., 2010). 4 saat anestezi uygulamasının ardından,

izofluran ve sevofluran anesteziklerinin her ikisi de nöro-apoptoza neden olurken, sadece izofluran, nöro-inflamasyon ve hafıza-öğrenme ile ilişkili proteinlerin anormal şekilde ekspresyonuna neden olmuştur (Zhao ve diğ., 2020). Farklı çalışmalarda da izofluranın, sevoflurana göre daha fazla miktarda nöro-apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Liang ve diğ., 2010; Kodama ve diğ., 2011).

İzofluranın neonatal dönemde etkilerini gösteren *in vivo* ve klinik çalışmalar Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

İZO’nun yenidoğan modellerinde (rat, fare, domuz ve makak) genellikle P7’de başlayan ve tekrarlı maruziyete bağlı olarak apoptotik nörodejenerasyon oluşumu ile ilişkisi ortaya konulmuştur (Wise-Faberowski ve diğ., 2005; Yon ve diğ., 2005; Stratmann ve diğ., 2006; Loepke ve diğ., 2007; Sanders ve diğ., 2009; Rizzi ve diğ., 2010; Istaphanous ve diğ., 2013; Creeley ve diğ., 2014; Maloney ve diğ., 2019; Demirgan ve diğ. 2021; Yılmaz ve diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024). Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir çalışmada İZO’nun tek bir anestezik ilaç olarak 4 saat boyunca uygulandığında, yetişkinlikte korku koşullanmasının ve mekansal öğrenmenin bozulmasına yol açtığı bildirilmiştir (Stratmann ve diğ., 2006). Farklı çalışmalarda ise kemirgenlerde 6 saatlik %1.5 İZO’ya tek sefer maruziyetin, ileri evrede mekansal öğrenme, hafıza ve davranış bozukluklarına neden olmadığı rapor edilmiştir (Loepke ve diğ., 2007; Demirgan ve diğ., 2019). Farklı hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, gebelik döneminde verilen İZO’nun yavrularda nöronal apoptozu artırdığı bildirilmiştir (Li ve diğ., 2007; Creeley ve diğ., 2014).

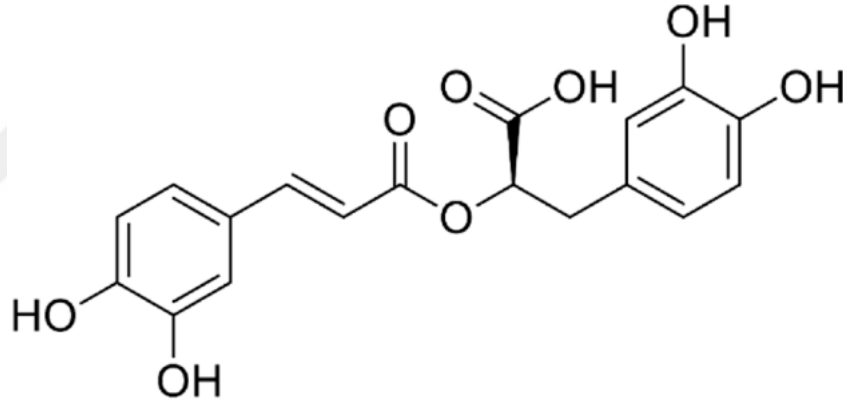
Bu konu ile ilgili önceki raporlarımız, tekrarlı İZO uygulamasının, neonatal hayvanların beyinde apoptoz (Demirgan ve diğ. 2021; Yılmaz ve diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024), oksidatif stres (Yılmaz ve diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ve inflamasyon (Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ile ilişkili protein seviyelerinde artışa neden olduğunu ve bilişsel işlev bozukluklarına ve tigmotaktik davranışa sebebiyet verdiğini göstermiştir (Demirgan ve diğ. 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024).

Tablo 2.1: Neonatal dönemde izofluran maruziyetinin olumsuz etkilerini gösteren *in vivo* ve klinik çalışmalar.

Ajan	Doz ve Süre	Çalışma Tasarımı	Yaş	Durum	Referans
İzofluran	13–497 MAC-saat	Kohort çalışması/ Klinik	0.06–19 yaş	Hastaların %50'sinde ajitasyon, amaçsız hareket görüldü.	Arnold ve diğ., 1993
İzofluran	%0.25–%1.5, 1–76 saat	Vaka-kontrol/ Klinik	0.5-10 yaş	İzofluran uygulamasından 24 saat sonra geçici ataksi, ajitasyon, halüsinasyonlar ve konfüzyon görüldü.	Kelsall ve diğ., 1994
İzofluran	81 MAC-saat	Vaka raporu/ Klinik	2.5 yaş	Miyastenia hastasında ince titreme görüldü.	McBeth ve Watkins, 1996
İzofluran	%0.4–%0.9, 6–8 gün	Vaka serisi/ Klinik	4-11 yaş	Geçici istemsiz hareketler, miyokloni, kısa nöbetler ve ataksi görüldü.	Sackey ve diğ., 2005
İzofluran +midazolam +morfin	%0.5–%1, 4 gün	Vaka raporu/ Klinik	7 yaş	Yön kaybı, halüsinasyonlar, ajitasyon ve nöbet görüldü.	Hughes ve diğ., 1993
İzofluran	1 MAC, 4 saat	<i>İn vivo</i> Rat	P7	Maruziyetten 5 ay sonra yetişkin hayvanlarda anormal korku davranışı ve 8. ayda öğrenme bozukluğu görüldü.	Stratmann ve diğ., 2006
İzofluran	%0.75–%1.5, 6 saat	<i>İn vivo</i> Rat	P1–3	Nöronal apoptozda anlamlı artış görüldü.	Yon ve diğ., 2005
İzofluran	%1.3, 6 saat	<i>İn vivo</i> Rat	Prenatal :E21	Retrosplenial korteks ve hipokampal CA1'de nörodejenerasyonda önemli artış görüldü.	Li ve diğ., 2007
İzofluran + N ₂ O	%0.75 + %75, 6 saat	<i>İn vivo</i> Rat	P7	Apoptotik nörodejenerasyonda artış görüldü.	Sanders ve diğ., 2009
İzofluran	%1.5, 6 saat	<i>İn vivo</i> Fare	P7	Artan nörodejenerasyon görüldü.	Loepke ve diğ., 2007
İzofluran + midazolam + N ₂ O	%0.55 + 1 mg/kg + %75, 4 saat	<i>İn vivo</i> Domuz	P5	Neokortekste artan nörodejenerasyon görüldü.	Rizzi ve diğ., 2010
İzofluran	%1.5, 5 saat	<i>İn vivo</i> Rat	P4–14	Artan nöronal hücre ölümü görüldü.	Wise-Faberowski ve diğ., 2005
İzofluran	%1.5, 6 Saat	<i>İn vivo</i> Fare	P7	Nöronal apoptotik hücre ölümü görüldü.	Istaphanous ve diğ., 2013
İzofluran	%1.0–1.5, 5 saat	<i>İn vivo</i> / Rhesus makak	Prenatal :E120	Beyninde nöron ve oligodendrositlerde kayıp görüldü.	Creeley ve diğ., 2014
İzofluran	%1.5, 3 Saat	<i>İn vivo</i> Fare	P3-P5-P7	Apoptotik dejenerasyon, motor koordinasyonunda ve kaygıyla ilişkili davranışta bozulma görüldü.	Maloney ve diğ., 2019
İzofluran	%1.5, 3 Saat	<i>İn vivo</i> Rat	P7-P9-P11	Nöronal apoptoz ve bilişsel işlevde bozukluk ile tigmotaktik davranışlarda artış görüldü.	Demirgan ve diğ. 2021
İzofluran	%1.5, 3 Saat	<i>İn vivo</i> Rat	P7-P9-P11	Beyinde apoptoz indüksiyonu ve oksidatif hasar görüldü.	Yılmaz ve diğ., 2023
İzofluran	%1.5, 3 Saat	<i>İn vivo</i> Rat	P7-P9-P11	Beyinde apoptotik, oksidatif ve inflamatuvar yanıtı ek olarak bilişsel işlev bozuklukları ve tigmotaktik davranışta artış görüldü.	Kargı-Gemici ve diğ., 2024

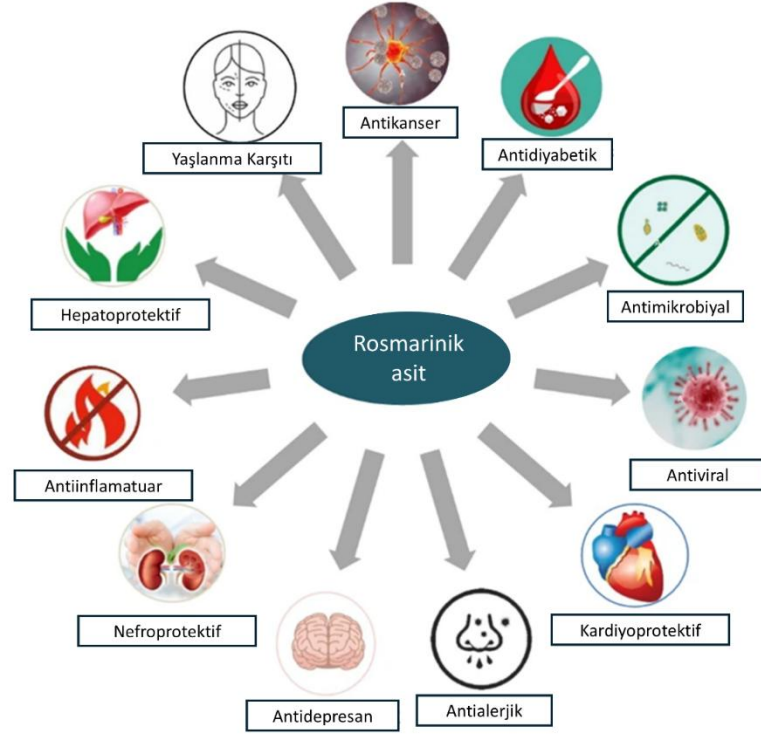
2.3. ROSMARİNİK ASİT

İki İtalyan kimyager Scarpati ve Oriente ilk kez 1958 yılında *Rosmarinus officinalis* bitkisinden rosmarinik asidi (RA) saflaştırmış ve elde ettikleri ürünü bitkiye uygun olarak isimlendirmişlerdir (Scarpati ve Oriente, 1958). Kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilaktik asidin bir esteri RA, *Boraginaceae* türlerinde ve *Lamiaceae*'nin *Nepetoideae* alt familyasında yaygın olarak bulunan doğal bir bileşiktir (Petersen ve Simmonds, 2003). RA yapısında içerdiği iki fenolik halkada *orto*-pozisyonda hidroksil grubu bulundurur. Bu fenolik halkaların arasında ise karboksilik asit, karbonil grubu ve doymamış bir çift bağ bulunmaktadır. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir (Elufioye ve Habtemariam, 2019; Nadeem ve diğ., 2019). RA düşük hidrofilik özelliği ve yüksek lipofilik karakterinden dolayı organik çözücülerde daha iyi çözünen bir bileşiktir (Petersen ve Simmonds, 2003; Noor ve diğ., 2022).



Şekil 2.6: Rosmarinik asidin kimyasal yapısı.

Son zamanlarda bitkiler ve onların sekonder metabolitleri üzerinde yapılan derinlemesine çalışmalar ile bitkisel doğal ürünler birçok araştırmacının dikkatini çekmiş ve pek çok hastalığa ve hasara karşı araştırma konusu olmuştur. Rosmarinik asit de özellikle son on yılda, üzerine araştırma yapılan önemli doğal potansiyel terapötiklerden biri haline gelmiştir. Güçlü bir antioksidan molekül olmasının yanı sıra, rosmarinik asitin anti-bakteriyel, anti-viral, anti-diyabetik, anti-alerjik, anti-depresan, anti-kanser, yaşlanma karşıtı, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nefroprotektif ve anti-inflamatuar gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere (Şekil 2.7) sahip olduğu belirlenmiştir (Nadeem ve diğ., 2019; Guan ve diğ., 2022).



Şekil 2.7: Rosmarinik asitin insan sağlığı üzerindeki farmakolojik etkileri (Noor ve diğ., 2022).

2.3.1. Rosmarinik Asitin Biyokoruyucu Etkileri

Rosmarinik asitin biyolojik açıdan yararlı etkilerini keşfetmek ve göstermek amacıyla çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma gerçekleştirilmiştir (Nadeem ve diğ., 2019). RA'nın en önemli biyolojik aktivitesi antioksidan özelliğidir. RA ile yapılan çalışmalar, bu doğal maddenin glutatyon (GSH) sentezini artırırken, lipid peroksidasyonunu ve NF- κ B ("nuclear factor - kappa B") aktivasyonunu inhibe ederek antioksidan etkilerini gösterdiğini rapor etmiştir (Adomako-Bonsu ve diğ., 2017; Lu ve diğ., 2017). *Caenorhabditis elegans*'ta yapılan bir çalışmada ise RA'nın GSH-Px ve katalaz (CAT, "catalase") aktivitesini önemli ölçüde artırdığı ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Lin ve diğ., 2019). RA uygulamasının, farelerde oksidatif akciğer hasarına bağlı olarak artan ROS ("reactive oxygen species"), NOX ("NADPH oxidases")-2 ve -4 seviyelerini düşürdüğü; ancak azalan SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerini ise arttırdığı bildirilmiştir (Liang ve diğ., 2020).

Dengesiz ROS artışı, inflamatuvar hastalıklar, enfeksiyon ve travma gibi durumlarda ortaya çıkan, dengesiz savunma tepkileri ile oluşan inflamasyonu, RA'nın azaltılabileceği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Bir *in vitro* çalışmada, kondrositlerde interlökin

(IL, “Interleukin”)-1 β indüklenmesi sonucunda kolajen-2 miktarında azalma, ECM (“extracellular matrix”)’de bozunma ve IL-6 seviyesinde artış görülmüştür. RA tedavisi sonrasında bu negatif etkilerin azaldığı tespit edilmiştir (Hu ve diğ., 2018). Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde RA uygulaması sonrasında NO (“Nitric oxide”) üretiminin, INF- β (“interferon- β ”), MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein-1”), iNOS (“inducible nitric oxide synthase”), IL-1 β , IL-6, IL-10 seviyelerinin ve NF- κ B aktivasyonunun azaldığı bildirilmiştir (So ve diğ., 2016). Kolit oluşturulmuş farelerde oral olarak verilen RA’nın IL-6, IL-1 β ve IL-22 gibi proinflamatuvar sitokinlerine ek olarak COX-2 ve iNOS proteinlerinin seviyelerini de azalttığı rapor edilmiştir (Jin ve diğ., 2017).

Dünya çapında önemli bir hastalık olarak listelenen diyabette, patolojik mekanizmalarının oksidatif stres ve inflamasyon süreçlerini tetiklemesi birçok dokuya ve organa büyük çapta hasar vermektedir (Cho ve diğ., 2018; Jin ve diğ. 2023). Önemli olarak, RA’nın anti-diyabet etkisi de yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Diyabet geliştirilmiş sıçanlarda azalan GLUT4 (“Glucose transporter-4,”) seviyesinin, RA kullanımı sonrasında arttığı ve insülin duyarlılığının iyileştiği bildirilmiştir (Runtuwene ve diğ. 2016). Streptozotosin (STZ) verilerek oluşturulan diyabetik sıçan modellerinde RA tedavisinin, böbrek ve karaciğerindeki TBARS (“thiobarbituric acid reactive substances”) düzeylerini düşürdüğü ve bunu SOD ve CAT aktivitesini artırarak yaptığı rapor edilmiştir (Mushtaq ve diğ., 2015). Bununla birlikte, RA’nın diyabete bağlı kandaki glikozu, ileri glikasyon son ürünlerini, HbA1c (glikozlanmış hemoglobin), IL-1 β , TNF- α (“tumor necrosis factor alpha”), IL-6, p-JNK (“phospho c-Jun N-terminal kinase”) ve NF- κ B seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Govindaraj ve Sorimuthu Pillai, 2015).

RA’nın organlarda meydana gelen hasarlara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri literatürde gösterilmiştir. Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kardiyomiyositlerde hipoksi/reoksijenasyon hasarı sonrasında oluşan LDH sızıntısının ve aşırı ROS miktarının, RA tedavisine bağlı olarak azaldığı ve hücrelerdeki ATP seviyesinin korunabildiği rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2014). RA’nın kardiyoprotektif aktivitesi, kalp kası hücrelerinin hücre içi ROS üretimini azaltması, mitokondri membran potansiyelinin geri kazanılması ve apoptozun engellenmesi üzerine işlevleriyle de gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2005). Li G.S. ve diğ. (2010) karaciğer fibrozuna karşı hepatoprotektif aktivitesini göstermek için yaptıkları çalışmada, RA’nın fibroz derecesini azalttığını ve TGF- β 1 (“transforming growth factor beta

1”) ile CTGF (“connective tissue growth factor”) anlatım seviyelerini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde farelerde karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen karaciğer fibrozunda RA uygulaması sonucunda, TGF- β 1, CTGF, NF- κ B, TNF- α ve COX-2 seviyelerinde azalma olduğu ve oksidatif/nitrozatif stresin zayıfladığı gösterilmiştir (Domitrović ve diğ., 2013).

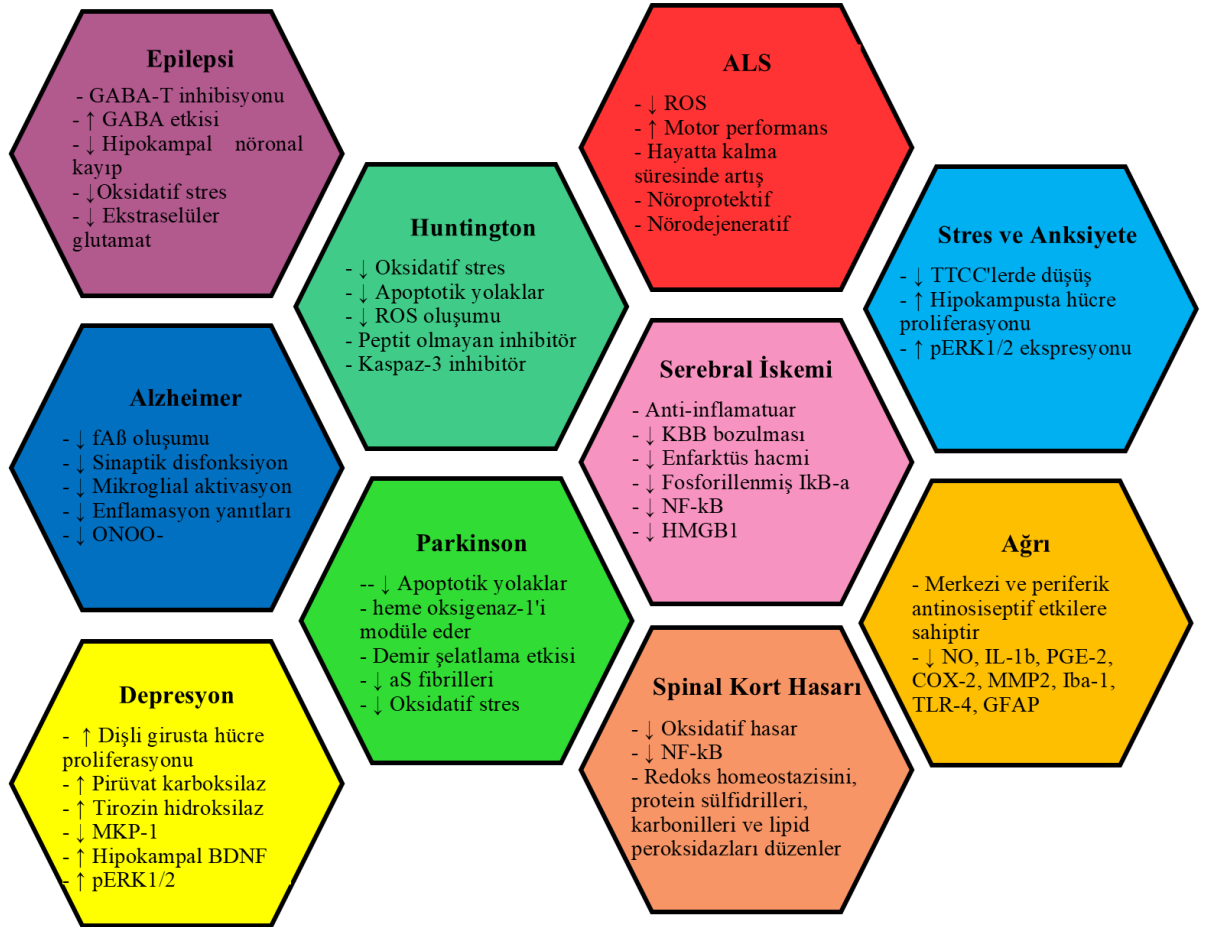
Antikanser ajanlar ve hastane enfeksiyonları gibi durumlar akut böbrek hasarına neden olabilmektedir (Dashti-Khavidaki ve diğ., 2013). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı RA tedavisinin sitokrom P450-2E1 ve HO-1 (“heme-oxygenase 1”) ekspresyonunu artırdığı, böbrekte inflamasyonu (TNF- α ve NF- κ B) ve apoptotik belirteçlerin (p53, fosforile p53 ve aktif kaspaz-3) seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Domitrović ve diğ., 2014). Ayrıca iskemi/reperfüzyon böbrek hasarına maruz kalan sıçanlarda RA’nın serum kreatinin ve kan üre azotu seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Ozturk ve diğ., 2014). RA’nın antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri dışında hücre stresinde, hücre döngüsünde, epitel-mezenkimal geçişte, Warburg etkisinde ve çeşitli hücre sinyal yollarında sergilediği biyolojik işlevlerle antikanser aktivitesi birçok çalışma ile literatürde gösterilmiştir (Şengelen ve Önay-Uçar, 2018; Ma ve diğ., 2020; Liu ve diğ., 2021; Zhou ve diğ., 2022; Şengelen ve Önay-Uçar, 2024).

Rosmarinik asitin en önemli işlevlerinden biri de nöroprotektif aktivitesidir. Birçok sinir sistemi problemine karşı terapötik potansiyelini ve etki mekanizmasını belirlemek için çok sayıda çalışma çeşitli araştırmacılar tarafından yürütülmüştür (Şekil 2.8) (Ghasemzadeh Rahbardar ve Hosseinzadeh, 2020).

Beyindeki aşırı nöronal fonksiyona ve atipik senkronik aktiviteye bağlı olarak gerçekleşen epilepside, artan GABA transaminaz aktivitesini RA’nın azaltabildiği bir *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (Awad ve diğ., 2009). RA’nın antiepileptik özelliğini lipid peroksidasyonu ve hipokampuste nörodejenerasyonu azaltarak sergilediğini gösteren *in vivo* çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (Lee ve diğ., 2008; Ghaffari ve diğ., 2014; Khamse ve diğ., 2015). Birçok çalışma, amyloid-beta (A β) ve mikrotübül ilişkili protein Tau birikimi sonucunda oluşan Alzheimer hastalığına karşı RA’nın terapötik potansiyelini göstermiştir. Alzheimer ile ilgili çalışmalarda, RA’nın A β oluşumunu azalttığı (Hamaguchi ve diğ., 2009; Ono ve diğ., 2012), alfa-sinüklein oluşumu engellediği ve bu oluşumlar var ise yıkımında rol oynadığı (Ono ve Yamada, 2006), oksidatif stresin azalmasında etkili olduğu (Kantar-Gok ve diğ.,

2017) ve tau fosforilasyonunu inhibe etmede işlev gösterdiği (Airoldi ve diğ., 2013; Shan ve diğ., 2016) bildirilmiştir.

Beyindeki sinir hücrelerinde dejenerasyon kaynaklı ölümcül bir genetik hastalık olan Huntington hastalığı üzerine yapılan bir çalışmada, RA tedavisinin davranışsal düzensizlikleri anlamlı şekilde düzelttiği ve oksidatif stres miktarını azalttığı bildirilmiştir (Bhatt ve diğ., 2015). Dopaminerjik nöronlarının ölümünden kaynaklanan ve hareketi bozan bir sinir sistemi bozukluğu olan Parkinson hastalığında (Soobrattee ve diğ., 2005) RA'nın Bax/Bcl2 oranını azaltıp, HO-1 seviyesini artırarak dopaminerjik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2008). Farklı bir nörodejeneratif hastalık olan Amyotrofik lateral skleroz (ALS)'da RA uygulamasının fare modelinde motor nöronların kaybını azalttığı, motor performansını iyileştirdiği ve sağkalımı uzattığı rapor edilmiştir (Shimojo ve diğ., 2010).



Şekil 2.8: Rosmarinik asidin sinir sistemi bozuklukları üzerindeki etki mekanizmaları (Ghasemzadeh Rahbardar ve Hosseinzadeh, 2020).

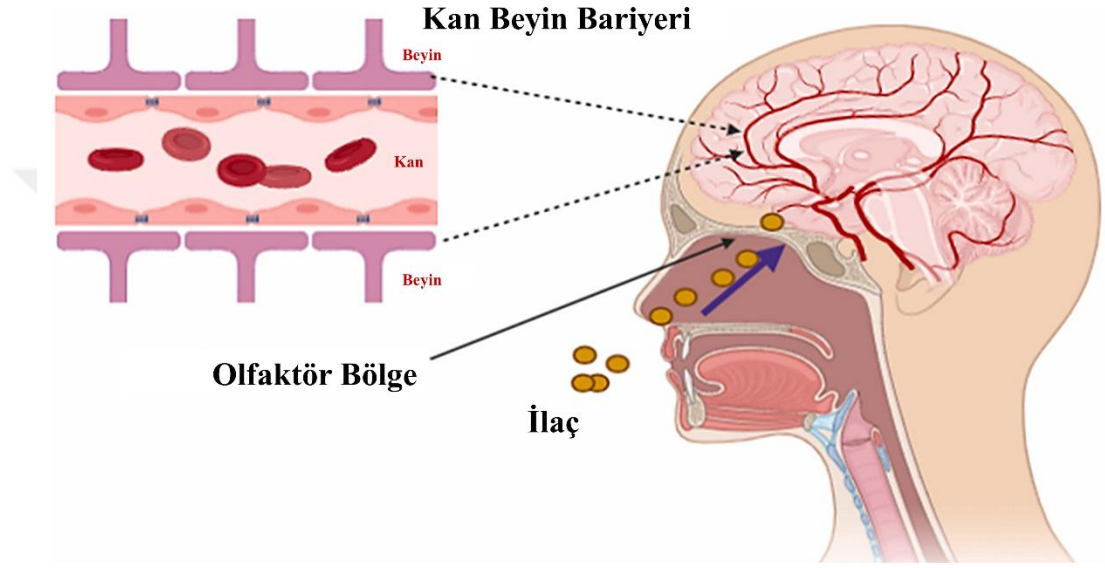
Nöroenez bozukluğuna bağlı depresyona karşı ise, RA'nın GABAerjik, serotoninerekjik ve dopaminerjik yollarda dzenleme yaparak (Sasaki ve diğ., 2013), hipokampusteki hcre proliferasyonunu arttırarak (Ito ve diğ., 2008) ve astrositlerde BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") ekspresyonunu upregüle ederek (Jin ve diğ., 2013) etki gösterdiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur.

Dünya çapında önemli bir ölüm sebebi olan beyin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı ise, RA tedavisinin BDNF seviyesinde artış (Fonteles ve diğ., 2016), inflamasyonda zayıflama (Luan ve diğ., 2013) ve apoptozda azalma (Kim ve diğ., 2014) sağladığı gösterilmiştir. Benzer şekilde omurilik yaralamasında, RA tedavisinin oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı rapor edilmiştir (Shang ve diğ., 2017). Ayrıca RA'nın ağrı kesici özelliğinin altında yatan mekanizmalarda anti-inflamatuar (Lucarini ve diğ., 2013; Boonyarikpunchai ve diğ., 2014), antioksidan (Ghasemzadeh Rahbardar ve diğ., 2017; Rahbardar ve diğ., 2018) ve antiapoptotik (Rahbardar ve diğ., 2018) etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur.

Çeşitli farmakolojik etkileri, özellikle nöroprotektif işlevi, üzerine kanıtlar artmasına rağmen, rosmarinik asitin bilişsel fonksiyon üzerindeki potansiyel terapötik etkileri belirsizliğini korumaktadır. Hassanzadeh-Taheri ve diğ. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlarda LPS ile indüklenen nöroinflamasyon ve bilişsel bozukluğa karşı, RA tedavisinin hipokampal nöral hcre kaybını, inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Benzer farklı çalışma ise, nazal RA uygulamasının, LPS kaynaklı hafıza eksikliklerine, nöro-inflamasyona ve oksidatif strese karşı nöroprotektif bir etki ortaya koyduğunu rapor etmiştir (Fachel ve diğ., 2020).

Dikkat çekici olarak rosmarinik asitin çok sayıda farmakolojik işlevi tanımlanmış olsa da, çeşitli *in vivo* alışmalar, ajanın biyolojik aktivitelerinin etkinliğinin vücuda alım yolu ve biyoyararlanıma bağlı olduğunu göstermiştir (Nunes ve diğ., 2017; Hitl ve diğ., 2021). Özellikle, kan-beyin bariyerinin ("blood brain barrier" BBB) varlığı terapötik ajanların beyne iletimindeki en büyük sorunlardan biridir (Wu ve diğ., 2023). İntraperitoneal uygulanan RA'nın en fazla böbrek, akciğer, dalak ve karaciğerde olduğu, beyinde ise oldukça düşük miktarda saptandığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2019). Oral yoldan alımda ise, RA'nın <%1 oranında bağırsaklardan emilebildiği rapor edilmiştir (Konishi ve Kobayashi, 2005). Diyete eklenen RA ise farelerin plazmasında saptanmış, ancak beyinde tespit edilememiştir (Hase ve

diğ., 2019). Bu noktada, nöroprotektif fonksiyonuna odaklanan çalışmalar için, BBB'yi aşmayı sağlayan intranasal uygulama yolu ön plana çıkmaktadır (Şekil 2.9). Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışma, RA yüklü lipid nanopartiküllerin intranasal yoldan uygulandığında kan beyin bariyerini geçtiğini göstermiştir (Bhatt ve diğ., 2015). Başka bir çalışma ise, nazal RA uygulamasının nöro-inflamasyonu hafiflettiğini ve nöroprotektif bir etki sergilediğini bildirmiştir (Fachel ve diğ., 2020).



Şekil 2.9: Beyne ilaç iletiminde intranasal yolun şematik gösterimi (Emad ve diğ., 2021).

2.4. STRES PROTEİNLERİ

Canlı hücreler yaşamları boyunca, akut ve kronik stres durumlarıyla mücadele etmek zorunda kalmaktadır. Ökaryotik hücreler bu stres durumlarıyla başa çıkabilmek için farklı adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Calabrese ve diğ., 2003). İlk kez 1962’de *Drosophila melanogaster*’de yapılan bir çalışmada ısı stresine karşı bir yanıt olarak anlatımı artan proteinler olarak tanımlanmış ve **ısı şoku proteinleri** (“Heat shock protein”, Hsp) olarak adlandırılmışlardır (Ritossa, 1962). Sonraları stres proteinleri olarak da isimlendirilmişlerdir. Bu proteinler, hücrede hem stres durumunda oluşacak yanıtları düzenlemede, hem de stressiz koşullarda farklı işlevler homeostazın sağlanmasında görev alırlar. Evrimsel olarak korunmuş olan bu protein grubu, hücrelerde diğer proteinler için bir şaperon olarak görev almaktadırlar. Moleküler şaperonlar olarak, proteinlerin stabilizasyonunu, translokasyonunu,

hatalı katlanan proteinlerin yeniden katlanmasını ve yıkılması gereken proteinlerin ise yıkıma yönlendirilmesini sağlarlar (Miller ve Fort, 2018). Ayrıca bu proteinler, strese karşı oluşacak yanıtları düzenleyerek hücre destek yapısı olan hücre iskeletini stabilize eder, apoptotik sinyalleri hafifletir, hasar almış proteinleri ubiquitin-proteazom sisteme yönlendirir ve otofaji yolunu kullanarak hücre devamlılığını sağlamaya destek olurlar (Garrido ve diğ., 2006; Sharp ve diğ., 2013; Lianos ve diğ., 2015; San Gil ve diğ., 2017).

2.4.1. Isı Şoku Proteinleri

Hsp'lerin genel işlevi yanlış katlanmış veya denatüre olmuş proteinleri tespit etmek ve onların moleküler süreçlerini düzenlemektir. Bazı Hsp'ler şaperon olarak, proteinlerin translayon sonrası ilk katlanma aşamalarında görev alırlar (Arispe ve diğ., 2002; Kampinga ve Craig, 2010; San Gil ve diğ., 2017). Stres durumunda bazı Hsp'ler yeni oluşan polipeptitlerin düzgün katlanmasında görev alırken, bazıları ise strese bağlı denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasında önemli bir rol oynarlar (Seigneuric ve diğ., 2011). Çok sayıda üyesi olan Hsp ailesinin sınıflandırılması farklı kriterler göz önüne alınarak yapılmıştır. Geçmişte Hsp'ler moleküler ağırlıklarına göre 6 aileye ayrılırken, güncel sınıflandırmaya göre HSPA (HSP70), HSPB (small HSP), HSPC (HSP90), HSPD/E (HSP60/HSP10), HSPH (HSP110), DNAJ (HSP40) ve CCT ("chaperonin containing T-complex polypeptide 1", TCP-1) olarak gruplandırılmışlardır. Her bir aile üyesinin farklı organlarda, farklı dokularda, farklı patolojik koşullarda ekspresyon seviyeleri değişmekte ve buna bağlı olarak fonksiyonları da farklılık göstermektedir (Kampinga ve diğ., 2009).

Hsp'ler birçok dokuda stres ve hasar durumunda işlev gördüğü gibi, beyinde de oluşan hasarlara ve çeşitli hastalıklara karşı nöroprotektif etkiler sergilerler. Epilepsi, travma, serebral iskemi ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok sinir sisteminin farklı patolojik koşullarında Hsp'lerin indüklendiği gösterilmiştir (Turturici ve diğ., 2014); bu Hsp indüksiyonu beyinde nöron, glia ve endotel gibi farklı hücre tiplerinde görülmüştür. Ayrıca nekrotik hücre ölümü veya fizyolojik salgı mekanizmaları aracılığıyla hücre dışındaki Hsp'lerin diğer hücrelere sinyal olarak giderek stres direncini arttırabildiği ortaya konulmuştur (Lyon ve Milligan, 2019).

HSPB ailesinin bir üyesi olan Hsp27'nin nöronlarda ekspresyon seviyesi düşük olmasına rağmen, proteotoksik stresle beraber artabildiği görülmüştür. Nörodejeneratif hastalıklarda

Hsp27 seviyelerinin artışı özellikle nöron ve glialarda normal proteinlerin patojenik birikimiyle ilişkili olabilmektedir (Koren ve diğ., 2009). Merkezi sinir sisteminde meydana genel hasarlara karşı Hsp27'nin antioksidan aktivite ortaya koyması ve hücre ölüm yollarını baskılaması, işlevi koruyucu görev almasına aracılık etmektedir (Zhou ve diğ., 2019). Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, Hsp27'nin beyindeki tau proteinlerinin agregasyonunun temizlenmesinde görev alarak, hafıza ve öğrenmeyle bağlantılı olan hipokampal nöronları koruyabileceği gösterilmiştir (Abisambra ve diğ., 2010). Farklı çalışmalarda ise A β toksik oligomerlerinin toksisitesini azaltabildiği (Ojha ve diğ., 2011) ve A β agregasyonunun azaltılmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Wilhelmus ve diğ., 2006; Yerbury ve diğ., 2016). Serebral iskemide aşırı Hsp27 artışının sitoprotektif rol oynadığı ortaya konmuştur (Stetler ve diğ., 2008). Multipl skleroz hastalarının serum ve beyin sıvılarında artan Hsp27 seviyesinin, proteinlerin yanlış katlanması ve agregasyonunu azaltarak nöronları koruyabileceği öne sürülmüştür (Ce ve diğ., 2011).

HSPD ailesinin bir üyesi olan Hsp60 esas olarak sitoprotektif işleve sahip bir stres proteini olup, eksikliği veya işlev bozukluğu çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Cappello ve diğ. 2014). Özellikle memeli nöronal veya glial hücrelerinde Hsp60 düzeyinin azalmasının, hücre ölümüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Christensen ve diğ. 2010). Huntington hastalığı üzerinde yapılan bir çalışmada ise Hsp60 aşırı ekspresyonunun, poliglutamin agregasyonunu ve toksisitesini baskıladığı bildirilmiştir (Wang ve diğ. 2009). Alzheimer hastalığında Hsp60'ın nöroprotektif rollerini gösteren çalışmalara karşı, bu protein ekspresyonunun artmasının hastalığın ilerlemesine katkısının olabileceği de ileri sürülmüştür (Jiang ve diğ., 2013). Parkinson hastalığı modellerinde yapılan çalışmalarda ise mikrogliya aktivasyonunda Hsp60'ın rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların Hsp60 seviyelerinin artışında işlevsel olduğu, miktarı artan ve salgılanan Hsp60'ın ise nöronal dejenerasyona katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Noelker ve diğ., 2014).

HSPA ailesinin üyesi olan Hsp70 ile ilişkili birçok çalışma literatürde bulunmaktadır. *İn vivo* nörodejenerasyon model çalışmalarında, artan Hsp70 düzeylerinin nöroprotektif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Turturici ve diğ., 2011; Lyon ve Milligan, 2019). Parkinson ile ilgili çalışmalar, Hsp70'in α -sinüklein (α -syn) agregatlarını çözebileceğini, ayrıca çözülmeyen α -syn formlarının şaperon aracılı otofaji ve proteozom yoluyla yıkımını indükleyebileceğini bildirmiştir (Labrador-Garrido ve Roodveldt, 2011; Witt, 2013). Hem

Alzheimer hastalarında hem de yaşlı bireylerde Hsp70'in ve indüklenebilir formunun ekspresyonunun azaldığı ve nöroprotektif mekanizmasında bozulmalar görüldüğü ortaya konmuştur (Franklin ve diğ., 2005). Alzheimer üzerine yapılan çeşitli çalışmalar Hsp70'in hücreyi amiloid birikimine karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermiştir (Magrané ve diğ., 2004; Evans ve diğ., 2006). Ayrıca birçok çalışma indüklenebilir Hsp70'in aşırı ekspresyonunun hayvan modellerinde serebral iskemiye karşı koruma sağladığını raporlamıştır (Kim ve diğ., 2020).

HSPC ailesinin bir üyesi olan Hsp90, protein agregasyonu ile karakterize Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Alzheimer hastalığı üzerine yapılan çalışmalarda, hiperfosforile tau proteini ve A β agregasyonun azalmasında Hsp90'nın işlevi sunulmuştur (Evans ve diğ., 2006; Dickey ve diğ., 2007). Ayrıca, Lewy cisimcikli demansta α -syn birikimlerini azaltabileceği gösterilmiştir (McLean ve diğ., 2004). Farklı olarak, beyin iskemi-reperfüzyon hasarında ise Hsp90 inhibisyonunun nöroprotektif bir etki sağladığı bildirilmiştir (Liang ve diğ., 2024). Benzer şekilde kan beyin bariyerinde önemli bir yeri olan beyin endotellerindeki artan ROS'un azaltılması için, Hsp90 inhibisyonunun bir hedef olabileceği rapor edilmiştir (Uddin ve diğ., 2021).

2.4.2. 14-3-3 Proteinleri

Gelişim sırasında beyinde yüksek oranda ekspresyonu yapılan 14-3-3 proteinleri, adını sığır beyin homojenatının DEAE-selüloz kromatografisinin 14. fraksiyonundan ve jel elektroforezindeki 3.3 pozisyonundaki konumundan dolayı almıştır (Moore ve Perez, 1967). 14-3-3 protein ailesi yedi izoformdan oluşmaktadır, bunlar β , γ , ϵ , η , ζ , σ ve τ/θ izoformlarıdır (Ichimura ve diğ., 1988). 14-3-3 proteinleri oldukça korunmuş dizilere ve izoformlar arasında büyük miktarda yapısal benzerliklere sahiptir (Aitken, 2006; Lau ve diğ., 2006). Bu protein ailesinde bulunan her üye homo- veya heterodimer oluşturur (Yaffe ve diğ., 1997). 14-3-3 dimerleri iki farklı proteine bağlanarak onları birbirine yakınlştırıp kararlı bir üçlü kompleks oluşumuna yol açabilmektedir (Fu ve diğ., 2000). Bu özelliği sayesinde 14-3-3 proteinleri enzimatik aktivitenin verimliliğini düzenler (Li ve diğ., 2008). 14-3-3 proteinlerinin başlıca işlevleri; belirli konformasyonları veya modifikasyonları stabilize etmek, enzim aktivitesini düzenlemek ve hücre altı lokalizasyonunu düzenlemektir (Shimada ve diğ., 2013).

Gelişim ve yetişkin dönemde, 14-3-3 proteinleri birçok farklı görevde rol oynarken çok sayıda substrat proteiniyle etkileşime girmektedirler (Mackintosh, 2004). Bu proteinler, beyin dokusunda yoğun şekilde bulunmaları ve sahip oldukları işlevlerinden ötürü, nöropatolojik süreçlerde önemli bir hedef olarak görülmüşlerdir (Steinacker ve diğ., 2011). Multipl skleroz (Colucci ve diğ., 2004), HIV ile ilişkili nörodejenerasyon (Morales ve diğ., 2012), Parkinson hastalığı (Yacoubian ve diğ., 2010) gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkisi ortaya konmuştur. Akut felç (Fujii ve diğ., 2005) ve subaraknoidal kanama (Siman ve diğ., 2011) gibi nöronların hasarları ile karakterize edilmiş sağlık sorunlarında biyobelirteç olarak görev alabilecekleri gösterilmiştir (Siman ve diğ., 2008; Goto ve diğ., 2009). Parkinson hastalığı ile ilişkili çalışmalarda, 14-3-3 proteinlerinin dopaminerjik sinyal yolunda rol oynadıkları gösterilmiştir (Shimada ve diğ., 2013). 14-3-3 ζ izoformunun dopamin sentezini yavaşlatan fosforile edilmiş tirozin hidroksilaz enzimine bağlanmasının, Parkinson tedavisi için terapötik bir hedef olabileceği ortaya konmuştur (Wang ve diğ., 2009). 14-3-3 proteinlerinin ALS’de stokiyometriyi düzenleyerek ve agregat oluşumunu önleyerek nörofilamentlerin kalite kontrolünde merkezi bir rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Kawamoto ve diğ., 2004; Okamoto ve diğ., 2011; Miao ve diğ., 2013). Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, 14-3-3 β , η ve ζ izoformlarının, Akt (PKB, “protein kinase B”) ve PKA (“cAMP-dependent protein kinase A”) tarafından fosforile edilmiş tau proteinine yüksek afiniteyle bağlandığı ve bu etkileşimin tau protein agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Sadik ve diğ., 2009). 14-3-3 proteinlerinin nöronal hücre sağkalımını teşvik etmede pozitif bir rol oynadığı ve Alzheimer patogenezinin karşı koruyabileceği, yapılan *in vivo* hastalık modeli çalışmalarında gösterilmiştir (Shimada ve diğ., 2013).

14-3-3 protein ailesi nörogenez sürecinde önemli rollere sahiptir. Farelerde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar 14-3-3 ϵ ve 14-3-3 ζ izoformlarının kortikal gelişim sırasında nörogenezi düzenlemede görev aldıklarını ortaya koymuştur (Toyo-Oka ve diğ., 2014). Ayrıca nöronal gelişimde apoptozun düzenlenmesinde 14-3-3 ϵ ve 14-3-3 ζ ’nin olası rolleri bildirilmiştir (van Hemert ve diğ., 2001; Gardino ve Yaffe, 2011). 14-3-3 ϵ ve 14-3-3 ζ ekspresyonu olmayan farelerde nörogenez ve nörodiferansiyasyonda değişimden sorumlu proteinin δ -katenin proteini olduğu bulunmuştur. 14-3-3 ϵ ve 14-3-3 ζ ’nin, δ -katenin ubiquitinasyonunu ve buna bağlı bozulmasını düzenlediği, 14-3-3 izoformlarının susturulması durumunda ise δ -katenin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2008; Poore ve diğ., 2010; Toyo-Oka ve diğ., 2014). 14-3-3 γ izoformunun farelerde embriyonik korteks gelişimi

sırasında doğum sonrası yedinci güne kadar yüksek oranda ekspresyonunun yapıldığı gösterilmiştir (Cornell ve diğ., 2016; Wachi ve diğ., 2016). Hücre döngüsünün kontrolünde düzenleyici bir rol oynamasına rağmen 14-3-3 σ izoformunun, özellikle kortekste düşük ekspresyonu nedeniyle nörogenez ve nöronal farklılaşmada önemli bir işleve sahip olmadığı rapor edilmiştir (Cornell ve Toyo-Oka, 2017). Yapılan çalışmalar 14-3-3 β 'nın ekspresyon düzeyleri ile kanser hücrelerin göç etme yeteneğinin orantılı olduğunu ileri sürmüştür, bu da kortikal gelişim sırasında 14-3-3 β 'nın nöronal göçte rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Park ve diğ., 2012; Cornell ve Toyo-Oka, 2017). 14-3-3 ailesi üyeleri ile yapılan çalışmalar, gelişmekte olan serebral kortekste ve çeşitli nörogelişimsel bozukluklarda bu proteinlerin temel roller oynadığını göstermiştir. Fakat çok sayıda işlevi ve hedefi nedeniyle bu protein ailesi hakkında halen bilinmeyen çok şey vardır. Kortikal gelişimin üç aşamasının (nörogenez, nöronal göç ve nöromorfogenez) herhangi birinde yer alıp almadıkları açısından henüz birçok 14-3-3 izoformu analiz edilmemiştir (Cornell ve Toyo-Oka, 2017).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI ve ETİK BİLDİRİMİ

Bu doktora tez çalışmasında doğum sonrası (postnatal, “P”) 7. gündeki (P7), 14-18 g ağırlığında Wistar albino sıçan (rat) yavruları kullanıldı. Tezin ilk aşamasında izofluran anestezisinin tek ya da tekrarlı uygulamasına karar verilmesi için 48 adet ratın dahil edildiği bir pilot çalışma yapıldı (Etik kurul onay numarası: 2021/98, 28 Temmuz 2021) ve önceki raporumuzda sonuçları sunuldu (Yılmaz ve diğ., 2023). İkinci aşamada ise rosmarinik asitin doz seçimine ilişkin 16 hayvanın kullanıldığı bir pilot çalışma gerçekleştirildi. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre her grupta 20 hayvan olacak şekilde deney grupları oluşturuldu. Tezin bu son aşamasında toplamda 84 adet Wistar albino rat yavrusu kullanıldı (Etik kurul onay numarası: 2021/79, 3 Mayıs 2021, bkz. EK 1). Uygulanacak tüm prosedürler, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul/Türkiye Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı ve İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Beceri Geliştirme Merkezi'nde (BADABEM) gerçekleştirildi. Hayvanlar 12:12 saatlik ışık periyodunda (ışıkların yakılması: 07.00, ışıkların kapatılması: 19.00), 20-22°C'taki nem kontrollü (%50-60) odalarda tutuldu. Bu süreçte hayvanlara standart laboratuvar diyeti ve su verildi. Tüm hayvan bakımı ve deney kapsamında uygulanan prosedürler, ARRIVE (“Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments”, Hayvan Araştırmaları: Canlı Deneylerde Raporlama) yönergelerine ve NIH (“National Institutes of Health”, Ulusal Sağlık Enstitüleri) laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Hayvanların acısını en aza indirmek ve deneylerde en az sayıda hayvan kullanmak için tüm çaba gösterildi.

3.2. İZOFLURAN ANESTEZİSİ UYGULAMASI

Bu tezin ilk aşamasında izofluran (İZO) anestezisinin uygulanış şeklini belirlemek amacıyla 48 adet ratın kullanıldığı bir pilot çalışma gerçekleştirildi. Tek ya da tekrarlı anestezi uygulamasının apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisi pilot çalışma kapsamında değerlendirildi. Bu kapsamda kontrol grubundaki ratlar (n=5) %30 oksijen içeren havaya, anestezi grubundaki ratlar (n=7) ise %30'u oksijen olan hava içerisinde %1.5 izoflurana

maruz bırakıldı. Tek anestezi uygulamasının değerlendirilmesi için uygulamalar P7’de yapılırken, tekrarlı anestezinin etkisi için P7+9+11 olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu pilot çalışma kapsamında oksijen uygulanan kontrol ratları O₁ (tek maruziyet) ve O₃ (tekrarlı maruziyet); izofluran uygulanan ratlar ise İZO₁ (tek maruziyet) ve İZO₃ (tekrarlı maruziyet) olarak gruplandırıldı. Ratlar her uygulama sonrasında gerekli prosedürler tamamlandıktan sonra annelerinin yanına verildi. P12’de tüm ratlar sakrifiye edildi ve ileri analizler için beyin dokuları -80°C’lık derin dondurucuda tutuldu.

Pilot çalışma ve ana deneylerdeki, tekrarlı anestezi uygulaması literatüre uygun olarak gerçekleştirildi (Demirgan ve diğ., 2021; Yılmaz ve diğ., 2023): P7, P9 ve P11’de (1 gün arayla ve toplamda üç kez) ratlar %30 oksijen içeren hava karışımında %1.5 İZO’ya (Forane-VR, Baxter Healthcare Corp, Deerfield, IL, ABD) maruz bırakıldı. Kontrol ratlarına ise belirtilen günlerde 3 saat boyunca %30 oksijenli hava verildi. Bu işlemler sıcaklık kontrollü (35–37°C) bir pleksiglas kutu (boyutlar: 20×20×60 cm) içerisinde yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Pleksiglas kutu içerisinde anestezi uygulaması.

Tüm rat yavruları deney boyunca solunum hızı, derinlik, cilt rengi ve genel görünüm açısından dikkatlice izlendi. Ek olarak, izofluran, oksijen ve karbondioksit seviyeleri, ekshale edilen gazın kızılötesi emilimi kullanılarak sürekli olarak izlendi (Datex-Ohmeda S/5 Avance, General Electric). CO₂ konsantrasyonunun 1–2 mmHg olması için devreye 5–7 L/dk olacak şekilde gaz akışı sağlandı. Anestezi prosedürlerden sonra, 20 dakika boyunca 6 L/dk akış hızında %70 O₂ uygulanarak ratların iyileşmelerine izin verildi. Akabinde 10 dakika oda

havasında beklendi ve bu sırada anesteziden derlenme kriteri olarak hayvanların solunum paterninin ve cilt renginin normal olması, dört ayak üzerinde nötral pozisyonda durabilmeleri ve aktif hareket edebilmeleri dikkate alındı. Derlenme sonrası yavru ratlar annelerinin olduğu kafeslere tekrar yerleştirildi.

3.3. İNTRANAZAL ROSMARİNİK ASİT UYGULAMASI

Bu tez çalışması kapsamında rosmarinik asitin (RA) nörokoruyucu işlevinin araştırılması amacıyla doz çalışması deneyleri gerçekleştirildi. RA (Sigma, #536954) dimetil sülfoksit (DMSO) içinde konsantrasyonu 500 mg/mL olacak şekilde çözündürüldü ve deneylerde kullanılacak doza uygun olarak serum fizyolojik ile seyreltilti.

Gerçekleştirilen bu pilot çalışmada 25 mg/kg [RA(1x)] ve 50 mg/kg [RA(2x)] olmak üzere RA'nın iki farklı konsantrasyonu ratlara anestezi uygulamasından 1 saat önce intranazal yolla verildi. Uygulanan RA dozları literatüre uygun olarak seçildi (Bhatt ve diğ., 2015). İntranazal uygulama sağ ve sol burun deliğinin her birine beşer kez olmak üzere toplamda 10 kez 1 µL RA verilmesi şeklinde yapıldı. Anestezideye bağlı olarak indüklenen apoptoz üzerindeki bu iki RA dozunun etkileri Western blot analizi ile değerlendirildi. Yapılan pilot çalışma sonucuna göre ilerleyen deneylerde 25 mg/kg RA dozunun kullanımına karar verildi. Ayrıca, yalnızca anestezi uygulamasından önce değil (Grup 3- RA+İZO grubu), aynı zamanda her oksijen uygulamasının 1 saat öncesinde intranazal RA uygulaması gerçekleştirilerek negatif kontrol grubu oluşturuldu (Grup 4- RA grubu).

3.4. DENEYSEL TASARIM ve ÇALIŞMA GRUPLARI

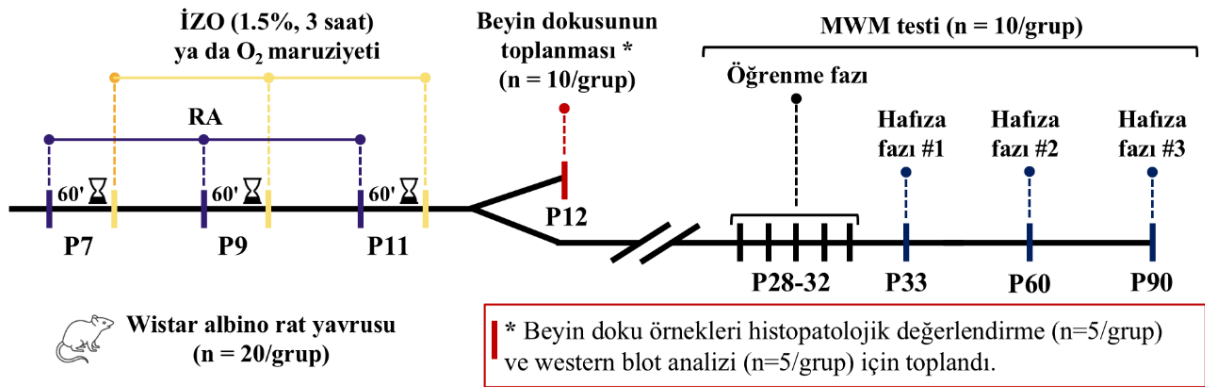
Yapılan pilot çalışmaların sonuçlarına göre tezin çalışma grupları belirlendi ve P7 rat yavruları rastgele dört gruba ayrıldı (n=20/grup):

- **Grup 1- KONTROL grubu:** Bu gruptaki ratlara doğum sonrası 7-9-11. günlerde 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı uygulandı. Ratlar her uygulama sonrası 30 dakika bekletildikten sonra annelerinin yanına verildi.
- **Grup 2- İZO grubu:** Bu gruptaki ratlara doğum sonrası 7-9-11. günlerde 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran (İZO) anestezisi

uygulandı. Ratlar her uygulama sonrası 30 dakika bekletildikten sonra annelerinin yanına verildi.

- **Grup 3- RA+İZO grubu:** Bu gruptaki ratlara doğum sonrası 7-9-11. günlerde 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% izofluran (İZO) anestezisi uygulamasından 1 saat önce intranasal yoldan 25 mg/kg rosmarinik asit (RA) verildi. Ratlar her uygulama sonrası 30 dakika bekletildikten sonra annelerinin yanına verildi.
- **Grup 4- RA grubu:** Bu gruptaki ratlara doğum sonrası 7-9-11. günlerde 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı uygulamasından 1 saat önce intranasal yoldan 25 mg/kg rosmarinik asit (RA) verildi. Ratlar her uygulama sonrası 30 dakika bekletildikten sonra annelerinin yanına verildi.

Deneyssel tasarım şematik olarak Şekil 3.2’de verildi. Doğum sonrası 7-9-11. günlerde (P7+9+11) O₂ ya da İZO uygulamaları tamamlandıktan sonra P12’de her gruptan 10 adet rat sakrifiye edildi ve beyin dokuları toplandı. Hipokampus beyin dokuları histopatolojik değerlendirme (n=5/grup) ve immünoyotlama analizi (n=5/grup) için kullanılıncaya kadar –80°C’lık derin dondurucuda uygun koşullarda saklandı. Her grupta kalan 10’ar rat ise Morris su labirenti (“Morris Water Maze”, MWM) deneylerine dahil edildi. MWM’nin öğrenme fazı hayvanların P28-32. günlerinde yapılırken; P33, P60 ve P90. günlerde ise hafıza fazı gerçekleştirildi.



Şekil 3.2: Deneyssel protokolün şematik gösterimi.

3.5. MORRİS SU LABİRENTİ (MWM) DENEYLERİ

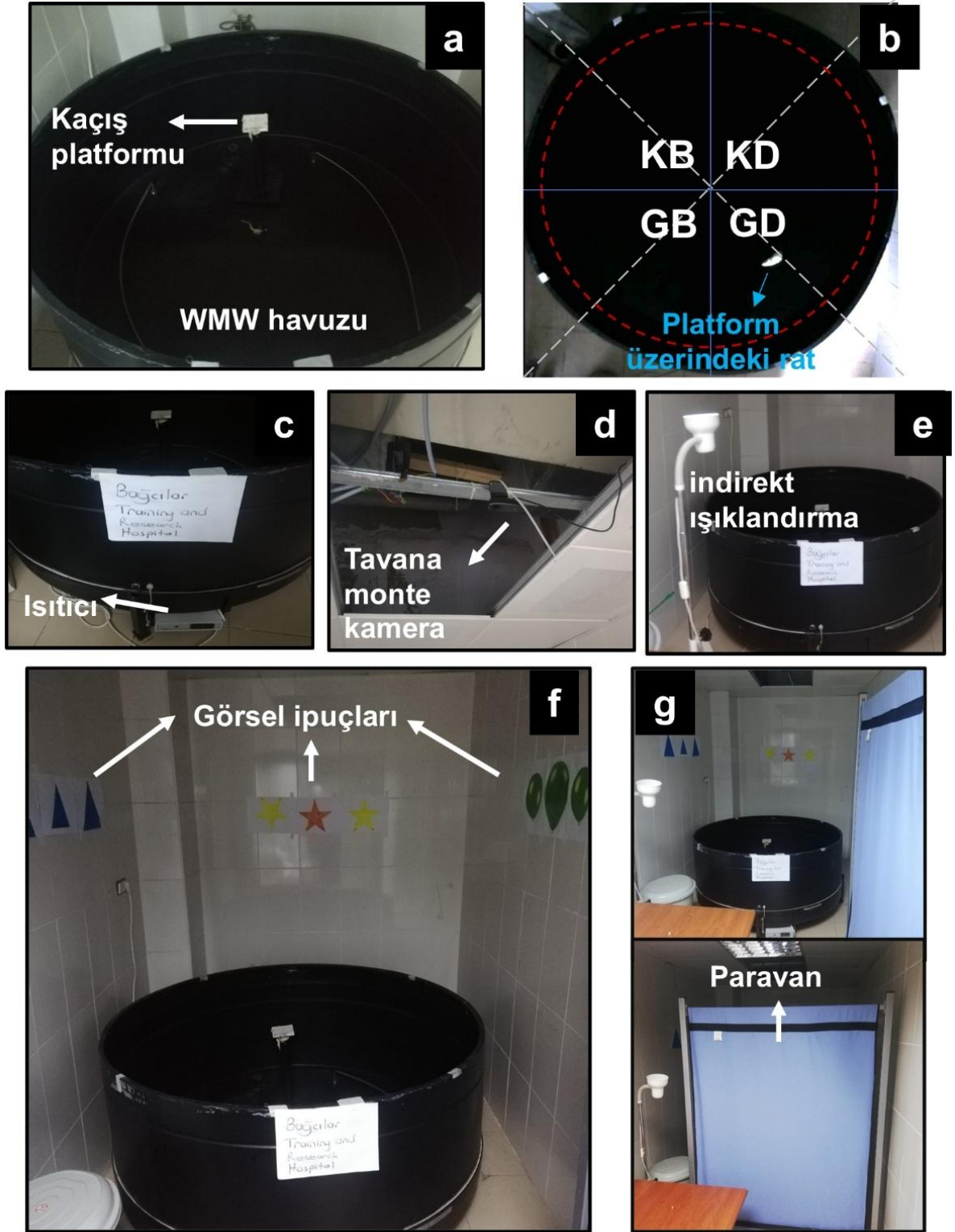
Anesteziye bağlı gelişen kognitif bozulmanın ve rosmarinik asit uygulamalarının, öğrenme ve hafıza üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılmasında Morris Su Labirenti (“Morris Water

Maze”, MWM) testi uygulandı. Bu test, 1984 yılında Morris tarafından tasarlanan bir su labirentinde kemirgenlerin mekânsal öğrenme yeteneklerini değerlendirerek uzaysal bellek parametreleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Öğrenme ve hafıza fazları olmak üzere temel iki aşamadan oluşmaktadır (Morris, 1984). Tez kapsamındaki MWM testlerinde, 150 cm çapında ve 60 cm derinliğe sahip içindeki su siyah gıda boyası ile boyanmış bir havuz kullanıldı. Deney sırasında oda ve havuzun içerisindeki su sıcaklığı $21\pm1^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlandı. Ratların öğrenme fazında, 10x10 cm boyutlarında yüzeye sahip olan pleksiglas malzemeden yapılmış kare şeklinde bir kaçış platformu kullanıldı ve bu aşamada, platformun yüzeyi havuz suyundan 1 cm aşağıda kalacak şekilde kaçış platformu MWM tankına yerleştirildi. MWM testleri boyunca, ratların uzaysal hafıza kazanmaları için odaya yerleştirilen işaretlerin konumları korundu. Ratların dikkatini dağıtmamak amacıyla MWM havuzu ile odanın geri kalan kısmını ayıran bir paravan yerleştirildi. Ayrıca, ışığın deneylere olumsuz etkisini önlemek amacıyla ışık (50 ± 10 lx) indirekt olarak odaya verildi ve yansıma yapması engellendi. MWM odasının görüntüsü Şekil 3.3’te verildi.

Öğrenme performanslarını değerlendirmek için doğumdan 28 gün sonra, 5 ardışık gün olmak üzere (P28-32. günlerde), günde 4 defa ratlar MWM havuzunda yüzdürüldü. Kuzeybatı (KB), Kuzeydoğu (KD), Güneybatı (GB) ve Güneydoğu (GD) şeklinde 4 yön MWM havuzunda işaretlenerek havuz 4 eşit kadrana ayrıldı. Öğrenme fazında siyah gıda boyası ile opaklaştırılmış suyun yüzeyinden 1 cm aşağıda kalacak şekilde ve havuzun kenarına 30 cm uzakta GD konumuna kaçış platformu yerleştirildi. Ratlar alıştırma denemelerinin her birinde havuzun farklı noktalarından havuza bırakıldı. Ratların havuza bırakıldığı konumlar Tablo 3.1’de verildi. Kaçış platformunun bulunacağı çeyrek ve ratların havuza bırakılacağı noktalar Vorhees ve Williams (2006) tarafından önerilen protokole göre belirlendi.

Tablo 3.1: MWM testinin öğrenme fazında ratların havuza bırakılma noktaları.

	Deneme 1	Deneme 2	Deneme 3	Deneme 4
1. gün	K	D	KD	KB
2. gün	KD	K	KB	D
3. gün	KB	KD	D	K
4. gün	D	KB	K	KB
5. gün	K	KD	D	KB



Şekil 3.3: MWM deneylerinin gerçekleştirildiği oda konfigürasyonu. **(a)** Su tankı ve kaçış platformu, **(b)** Kesikli gri çizgiler MWM testinin dört kadranı gösterir: Kuzeydoğu (KD), Kuzeybatı (KB), Güneydoğu (GD) ve Güneybatı (GB). Kırmızı kesikli çizgiler ile havuz duvarı arasındaki alan tigmotaksis alanını temsil eder. **(c)** Su sıcaklığını ayarlayan ısıtıcı. **(d)** Deney kaydını sağlayan tavana monte edilmiş kamera. **(e)** İndirekt aydınlatma. **(f)** Farklı şekil, boyut ve renklerdeki görsel ipuçları. **(g)** Test alanını, deney yapan araştırmacı ve diğer faktörlerden ayıran paravan.

Öğrenme aşamasında, ratlar kuyruklarından tutularak havuzun kenarına bakacak şekilde yavaşça suya bırakıldı ve kaçış platformunu bulması için her bir rata 60 saniye (sn) süre verildi. Platformu bulan ratların 20 sn platform üzerinde kalmasına izin verilirken, bulamayan ratlar deneyi gerçekleştiren kişi tarafından platforma yönlendirildi ve platformda 30 sn bekletildi. Her bir deneme günü yapılan 4 yüzdürme sonucuna ait değerler ve bunların ortalaması kaydedildi. Dijital kamera tarafından hayvanların yüzme görüntüleri kaydedilerek; kaçış platformunu bulma süreleri, hedef kadranda geçirilen süre ve yüzme hızları belirlendi.

MWM testinin hafıza fazı doğum sonrası 33. (P33, hafıza testi #1), 60. (P60, hafıza testi #2), ve 90. (P90, hafıza testi #3), günlerde gerçekleştirildi. Bu testlerde, kaçış platformu havuzdan kaldırıldı. Ratlar kaçış platformuna en uzak noktadan (KB) havuz bırakıldı ve 60 saniye boyunca yüzdürüldü. Dijital kamera tarafından yüzme görüntüleri kaydedilen her bir hayvanın eski platform alanından geçiş sayısı, hedef kadranda (GD bölgesi) geçirdiği süresi ve yüzme hızı incelendi.

Ratların yüzmeleri sırasında kaydedilen videolar “Weeny Free Video Converter-2” (Sürüm 2.0) yazılımı kullanılarak dönüştürüldü. Hareket verileri (platformu buluş süresi, hız, eski platform alanından geçiş sayısı ve hedef kadranda geçirilen süre) ve yüzme yolu ImageJ 1.52u (NIH, ABD) ve “Animal Tracker” yazılımında (Gulyás ve diğ., 2016) videoların analizlenmesiyle elde edildi. Ayrıca, ratların yüzme profilleri incelendi ve havuz kenarına 10 cm yakınlıktaki bölgede geçirilen zamanın yüzdesi hesaplanarak tigmotaksis değerlendirildi. Genellikle bir kaygı indeksi olarak kabul edilen tigmotaktik davranış (Higaki ve diğ., 2018), ratlarda anesteziye bağlı anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanıldı.

3.6. BEYİN DOKULARININ HAZIRLANMASI

Her gruptan 10 adet rat son anestezi ve/veya oksijen hava karışımı uygulamasından 24 saat sonra (doğum sonrası 12. günde) izofluran ile anestezi altına alındı. Her gruptan beşer hayvan histopatolojik değerlendirme ve immünoablottama analizleri için ayrıldı (sakrifikasyon prosedürleri açısından farklılık mevcuttur).

Histopatolojik analizde kullanılacak örnekler için, ratlar önce soğuk PBS (0.01 M, pH 7.4) ile ardından ise ardından %10 formalin ile perfüze edildi. Beyin dokusu, giyotin kullanılarak vücuttan ayrılan başın kranial boşluğundan çıkarıldı. Dokular önce su ile yıkandı, ardından

kademeli olarak %70, %80, %90, %96 ve %100'luk alkollerin her birinde 5 dk boyunca bekletilerek dehidratasyon işlemine tabi tutuldu. Dokular, şeffaflaştırma amacıyla 2 kez 10 dk ksilende bekletildi. Ardından 60°C'lık etüvde eritilmiş parafinde gece boyunca bekletildi ve kasetler bloklandı. Hematoksilen-eozin (HE) ve immunohistokimyasal (IHC) boyama işlemlerinde kullanılacak 2 µm'lik doku kesitleri döner mikrotom (Leica RM2255) ile elde edildi ve preparatlar oda sıcaklığında saklandı (Zheng ve diğ., 2020).

Western blot analizinde kullanılacak ratlara anestezi sonrasında torakotomi uygulandı. Kalp, atriumlar ve ventriküller görünür hale getirildi. Sağ atriumda 11 numara bistüri ile küçük bir insizyon uygulandı. Sol ventrikülden transkardiyak PBS perfüzyonu yapıldı, dekapitasyon işlemi gilyotin ile uygulandı ve beyin dokusu kranial kaviteden çıkartıldı. Buz aküleri ile soğutulmuş kesme tahtası üzerinde beynin hipokampus bölümü diseke edildi, steril tüp içerisine aktarıldı, sıvı azot ile donduruldu ve -80°C'lık derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.7. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER

3.7.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama

Hazırlanan doku preparatları 2 kez 1 saatlik ksilolde tutularak deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Sonra, %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinde ve dH₂O'da bekletilerek rehidrate edildi. Kesitler 2 dk hematoksilen boyasında (Bio Optica 05-06002) ve 10 dk eozin boyasında (Histoplus HST-EOA-0500) bekletildi, fazla boya su ile uzaklaştırıldı ve düşükten yükseğe alkol serilerinden tekrar geçirilerek dehidratasyon yapıldı. Kesitleri şeffaflaştırmak için preparatlar 2 kez 10 dk ksilende bekletildi ve ardından kesitlerin üzeri entellan ile kapatıldı. Boyaması yapılan hipokampus bölümlerine ait slaytlar ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi (Olympus BX51, Tokyo, Japan). Slaytlarda bulunan hücre büzülmesi, hücre-hücre temasının kaybı, piknotik nükleuslar, sitoplazmik yoğunlaşma ve boş vezikül görüntüsü apoptotik hücre göstergesi olarak kabul edildi (Garman 2011; Bradley ve diğ., 2020). Rasgele beş alandan hücre sayımı yapılarak apoptotik hücre miktarının yüzdesi belirlendi.

3.7.2. İmmünohistokimyasal (IHC) Boyama

Hazırlanan doku preparatlarının immünohistokimyasal analizleri, otomatik bir immünohistokimyasal boyayıcı (Ventana BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, ABD) ve tam otomatik immün boyama cihaz kiti (UltraView Universal

DAB Detection kit, ROCHE/Ventana R 05269806001) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği prosedür takip edilerek gerçekleştirildi. Hipokampus beyin bölümü kesitleri, ilk olarak EZ hazırlama çözeltisi (Ventana) kullanılarak deparafinize edildi, 98°C'ta 60 dk boyunca antijen geri alma tamponuyla (CC1 çözeltisi, Ventana) inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 hidrojen peroksit ile 37°C'ta 4 dk inkübasyon gerçekleştirildi ve kesitler anti-aktif-kaspaz-3 (cleaved-Cas3, 1:400, 9661, Cell Signaling) primer antikoru ile 37°C'ta 60 dk boyunca inkübe edildi. Antikor bağlanmasını saptamak için hidrojen peroksit substratı ve diaminobenzidin tetrahidroklorür kromojeni içeren Ventana ultraView DAB Saptama kiti (Ventana Medical Systems, Inc.) kullanıldı. En son basamakta, karşıt boyama için Ventana hematoksilin ve mavileştirme reaktifi kullanıldı. Boyama sonrası kesitler Tris tamponu (pH 7.6) ile yıkandı. Kesitler ksilen bazlı bir kaplama çözeltisi kullanılarak kapatıldı ve ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak görüntülendi. Aktif-kaspaz-3 miktarının belirlenmesi için IHC analizi pozitif hücrelerin yüzdesi kullanılarak yapıldı.

3.8. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.8.1. Dokudan Protein İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini

Hipokampus beyin dokusundan protein izolasyonu daha önce gerçekleştirilen çalışmalara göre yapıldı (Demirgan ve diğ., 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024). Derin dondurucuda soğutulmuş havanlara konulan doku örneklerinin (~25 mg) üzerine sıvı nitrojen eklendi ve havan tokmağı yardımıyla dokunun iyice ezilmesi ve parçalanması sağlanarak, doku toz haline getirildi. Soğuk lizis tamponu [50mM Tris (#T1503, Sigma)-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl (#106400, Merck), %1 NP-40 (#A1694, AppliChem), %1 Triton X-100 (#T8787, Sigma), %10 gliserol (#G5516, Sigma), 1mM PMSF (#A0999, AppliChem) ve EDTA (etilendiamintetraasetik asit) içermeyen proteaz inhibitör kokteyli (1 tablet/50mL, #11873580, Roche)] toz haldeki örnek üzerine eklenip (400 µL) 5 dk +4°C'ta inkübe edildi. Ardından lizis tamponu ile doku homojenizasyonu sağlandı ve homojenat 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Örnekler 4°C'ta, 20000xg, 20 dk santrifüjlendi (Sigma 3-30K) ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

Örneklerin protein konsantrasyonunu belirlemek için bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanıldı (Smith ve diğ. 1985, Walker, 2002a). Bu yöntem, proteinlerin peptit bağları tarafından Cu^{2+} iyonlarının Cu^{+} 'ya indirgenmesine ve BCA çözeltisinin Cu^{+} iyonları ile mor

renkli sodyum tuzu oluşturmasına dayanan kolorimetrik bir testtir. Elde edilen lizatların protein konsantrasyonları ticari bir BCA kiti (SMART™ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotech.) yardımı ile belirlendi. Konsantrasyon tayininde kullanılacak standart grafiğın eldesi için kit içinde bulunan BSA (“Bovine Serum Albumin”) kullanıldı. BSA’nın 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL olacak şekilde dH₂O ile dilüsyonları yapıldı ve üretici firmanın protokolüne göre standart grafik oluşturuldu. Her bir dokudan elde edilen örneğın protein konsantrasyonunu tayin etmek amacıyla örnekler 10 kat dilüe edildi ve bu dilüsyonlardan 96-kuyucuklu mikrolakaya iki tekrar olacak şekilde 25 µL konuldu. Kör örnek (“blank”) olarak lizis tamponu kullanıldı. Kitin içinde bulunan A:B reaktifleri 50:1 (v/v) oranında karıştırılıp her bir kuyuya 200 µL eklendikten sonra iyice karışması için çalkalandı (Heidolph Unimax 1010). Mikrolaka 30 dk 37°C’lık etüvde inkübe edildikten sonra spektrofotometre cihazında (EON mikrolaka okuyucu, BioTek Instruments Inc.) oluşan renkli ürünün 562 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü ve oluşturulan standart grafiğın denklemine göre protein konsantrasyonu (µg/mL) hesaplandı.

3.8.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve İmmünoblotlama

Hipokampuse ait örneklerdeki hedeflenen proteinlerin anlatımlarındaki değışimlerin ortaya konulması amacıyla öncelikle denatüre jel elektroföresi (SDS-PAGE, “sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis”) ile proteinler kDa’larına göre ayrıştırıldı. Ardından elektrotransfer ve immünoblotlama işlemleri uygulandı (Walker, 2002b).

Bu aşamada kullanılan Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) sisteminde jel hazırlığı Tablo 3.2’de verilen çözeltiler kullanılarak yapıldı. Tüm çözeltilerin içerikleri Tablo 3.3’te verildi.

Tablo 3.2: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli hacimler).

Jel İçerikleri	Ayırma Jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Stok Akrilamid Çözeltisi	1.662 mL	337.5 µL
%10 SDS	50 µL	25 µL
%10 APS	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

Tablo 3.3: SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
%30 Akrlamid stok solüsyonu	Akrlamid (Sigma A3553)..... 30 g Bis-Akrlamid (Sigma M2022)..... 0.8 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz (Sigma T1503)..... 45.43 g 3N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz 14.54 g 3N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS (AppliChem A2263)..... 10 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
%10 Amonyum persülfat (APS)	APS (AppliChem A2941)..... 0.1 g dH ₂ O ile son hacim 1 mL'ye tamamlandı. Jel döküleceği zaman taze hazırlandı.
1X Yürütme tamponu (pH 8.3)	Trizma-Baz (25 mM)..... 3.03 g Glisin (192 mM) (AppliChem A1067)..... 14.4 g SDS (%0.1)..... 1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
4X Örnek yükleme tamponu (Laemmli buffer)	Trizma-Baz (250 mM, HCl ile pH 6.8 olarak ayarlandı)..... 0.76 g SDS (%4)..... 1 g Gliserol (%40) 10 mL Bromo-fenol mavisi (%0.02, Merck 108122)..... 5 mg dH ₂ O ile son hacim 25 mL'ye tamamlandı. 900 µL alikot olarak -20°C'ta saklandı β-Merkaptoetanol (AppliChem A1108) 900 µL tampona 100 µL eklendi

Ayırma jeli %10, yükleme jeli ise %5 akrilamid içerecek şekilde jel sistemine döküldü ve örnek yükleme kuyucuklarını oluşturmak amacıyla kasetin üst kısmına 1 mm'lik tarak yerleştirildi. Protein örnekleri 4X Laemmli buffer ile karıştırılıp 95°C'ta 5 dk ısıtıldı ve her kuyucuğa 30µg olacak şekilde yüklendi. Proteinlerin kDa'larını belirleyebilmek amacıyla bir kuyucuğa protein marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, #26619, Thermo)

yüklendi. Elektroforez işlemi 100V'ta başlatılıp, bromofenol mavisine ait çizgi ayırma jelini geçtikten sonra 200V'ta devam ettirildi.

SDS-PAGE elektroforez işlemi bittikten sonra, jeldeki proteinler membrana aktarılarak immünolojik analizler gerçekleştirildi. Bu aşamada kullanılan tüm tamponlar ve antikorlar Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.4: Elektrotransfer, immünoblotlama ve “stripping” işlemlerinde kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
1X Transfer Tamponu	Trizma-Baz (25mM, Sigma T1503) 3.03 g Glisin (192 mM, AppliChem A1067)..... 14.4 g Metanol.....200 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
%5'lik Bloklama Tamponu	Yağsız süt tozu (Sigma 70166)..... 5 g Son hacim 1X yıkama tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
1X Yıkama Tamponu (TBS-T tamponu)	Trizma-Baz (20 mM, pH: 7.5)..... 2.42 g NaCl (150 mM) (Merck 106400) 8.77 g Tween-20 (%0.1)..... 1 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
“Stripping” Tamponu	%10'luk SDS çözeltisi.....20 mL 0.6 M Tris-HCl (pH:6.8) tamponu.....10 mL Ultra saf su.....70 mL β-merkaptoetanol.....0.8 mL

İlk basamakta, jel transfer tamponuna alındı ve 10 dk boyunca yavaş hızda çalkalandı. Ardından elektrotransfer ve western blotlama basamaklarına geçildi. Elektrotransfer için “Trans-Blot Turbo (Bio-Rad)” sistemi ve PVDF membran kullanıldı. Bu işlemde, elektrotransfer cihazının anot kısmından başlamak üzere sırasıyla transfer tamponunda ıslatılmış transfer kâğıdı (#1704156, Bio-Rad), metanolde inkübe edilmiş PVDF membran (0.22 µm, Bio-Rad), jel ve tekrar transfer kâğıdı konulup kaset kapatıldı. 25 V'ta 15 dk olacak şekilde elektrotransfer gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: İmmünoyblotlama deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Kod	Marka
Anti-14-3-3 β (beta)	Tavşan	1:2000	BML-SA474	Enzo Life Sci.
Anti-14-3-3 γ (gama)	Fare	1:2000	NB100-407	Novus
Anti-14-3-3 ϵ (epsilon)	Tavşan	1:2000	NAP 1-89827	Novus
Anti-14-3-3 ζ (zeta)	Tavşan	1:2000	BML-SA482	Enzo Life Sci.
Anti-14-3-3 σ (sigma)	Tavşan	1:2000	BML-SA480	Enzo Life Sci.
Anti-14-3-3 τ (teta/tau)	Tavşan	1:2000	NAP 1-31537	Novus
Anti-14-3-3 η (eta)	Tavşan	1:2000	BML-SA476	Enzo Life Sci.
Anti-Hsp60	Tavşan	1:2000	NBP1-77397	Novus
Anti-Hsp70	Tavşan	1:1000	NBP2-16896	Novus
Anti-Hsp90	Fare	1:1000	NB100-1972	Novus
Anti-HSF1/p-HSF1	Tavşan	1:1000	NBP1-97475	Novus
Anti-Bax	Tavşan	1:1000	A00183	Boster
Anti-Bcl-2	Tavşan	1:1000	NBP2-30108	Novus
Anti-Cas-3 pro ve kesilmiş form	Fare	1:1000	NB100-56708	Novus
Anti-PARP1 pro ve kesilmiş form	Tavşan	1:1000	M00122	Boster
Anti-SOD1	Tavşan	1:2000	NBP1-90186	Novus
Anti-GPX1	Tavşan	1:2000	NBP1-33620	Novus
Anti-NF- κ B p65	Tavşan	1:1000	A00284-1	Boster
Anti-TNF- α	Tavşan	1:1000	NB600-587	Novus
Anti-4HNE	Fare	1:1000	MAB3249	R&D Systems
Anti- β -aktin	Fare	1:5000	NB600-501	Novus
Anti-GAPDH	Fare	1:2500	MA5-15738	Thermo
Anti-Fare IgG	Keçi	1:5000	BA1050	Boster
Anti-Tavşan IgG	Keçi	1:5000	BA1054	Boster

Elektrotransfer sonrası membran, %5 (w/v)'lik yağsız süt tozu (#70166, Sigma) ile hazırlanan bloklama tamponunda bir çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi ve hedeflenen proteine ait özgün primer antikor ile 4°C'ta gece boyunca muamele edildi. β -aktin ve GAPDH, immünoiblotlama işlemlerinde yükleme kontrolü için kullanıldı. İnkübasyon sonrası membran TBS-T tamponu ile 5 kez 5 dk yıkandı ve uygun HRP-işaretli sekonder antikor ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından membran fazla sekonder antikorun uzaklaştırılması için tekrar TBS-T ile yıkandı. "SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo 34580)" kemilüminesan substratı kullanılarak protein bantları, ChemiDoc XRS sistemi/ImageLab 6.0.1 yazılımı (Bio-Rad) ile görüntülendi.

Membranlarda farklı hedef proteinlerin anlatımlarını inceleyebilmek amacıyla "stripping" işlemi yapıldı. Hazırlanan "stripping" tamponu 50°C'ta ısıtıldı ve membran üzerine dökülüp 30 dk 50°C'ta inkübe edildi. Ardından membran, önce ultrasaf su ile (10 dk arayla 6 kez) sonrasında TBS-T tamponu ile (5 dk arayla 5 kez) yıkanıp bloklama tamponuna alındı. Hedef proteine özgün primer antikor ile tekrar inkübe edilen membran için de yukarıdaki işlemler gerçekleştirilip, görüntüleme yapıldı.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu tez kapsamında güç analizi ("Power analysis"), çalışmanın ana çıktısı olan MWM testine odaklanarak gerçekleştirildi. Bunun için, G-Power yazılımı (sürüm 3.1.9.7) ve F post-hoc testi kullanıldı. Grup sayısı 4, toplam örneklem büyüklüğü 80, etki büyüklüğü 0.40 ve α hata olasılığı 0.05 değerlerine dayanarak güç 0.85 olarak hesaplandı. Bu değer örneklem büyüklüğünün uygunluğunu gösterdi (Faul ve diğ., 2007).

İstatistiksel analizler GraphPad Prism Software versiyon 10.4.1 (La Jolla California USA) kullanılarak yapıldı. Veriler, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ("Standard error of the mean" SEM) olarak sunuldu. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Çoklu karşılaştırmalar tek yönlü veya iki yönlü varyans analizini (ANOVA) takiben, Tukey post-hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

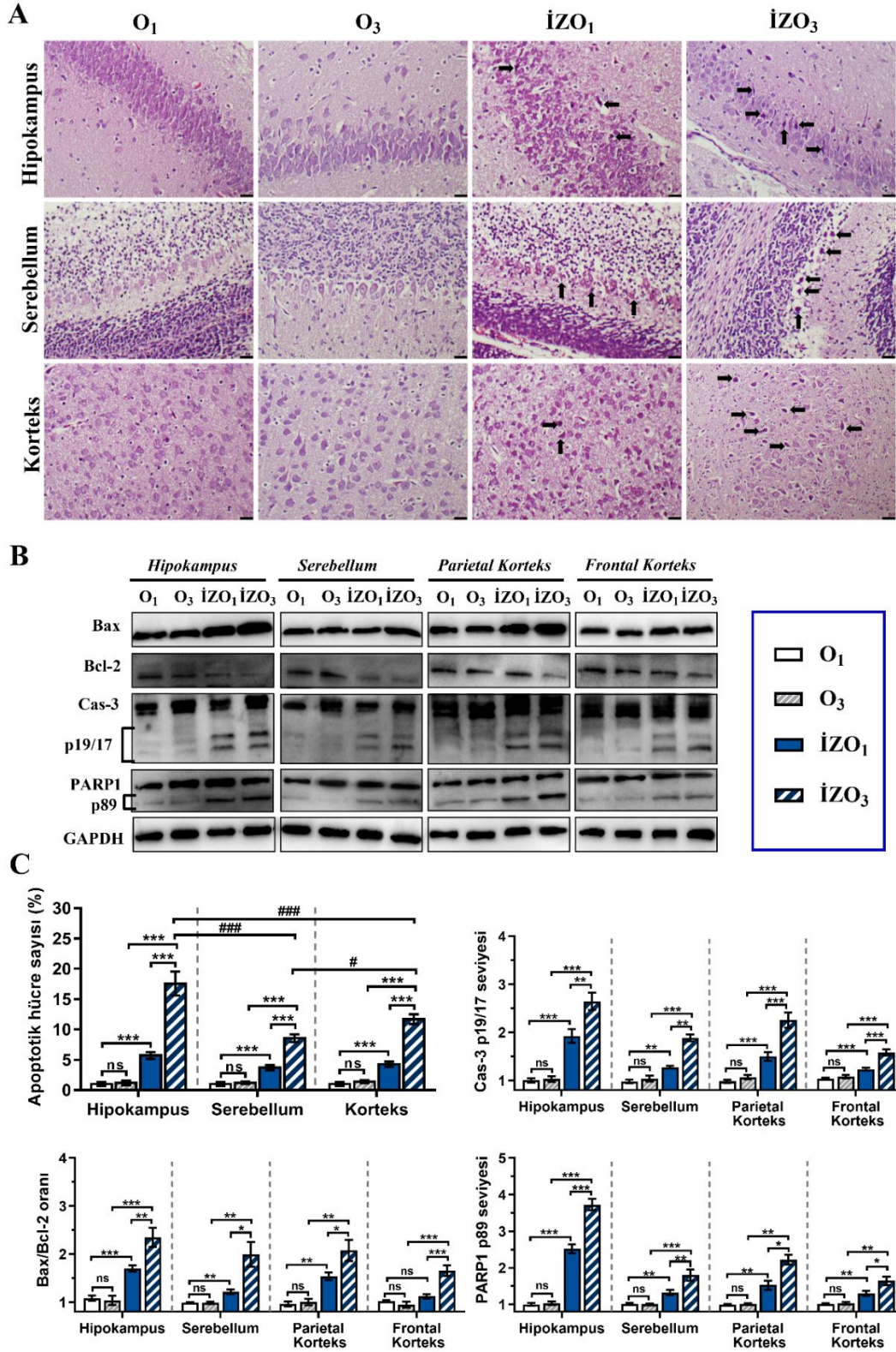
4. BULGULAR

4.1. PİLOT ÇALIŞMA SONUÇLARI

Bu tez kapsamında toksisitesi araştırılan izofluran (İZO) anesteziğinin uygulama şeklinin ve koruyucu etkisi araştırılan rosmarinik asitin (RA) uygulanacak dozunun belirlenmesi amacıyla pilot çalışma gerçekleştirildi. Bu çalışmalara ait sonuçlar aşağıda sunuldu.

4.1.1. İzofluran Anesteziği Pilot Çalışması Sonuçları

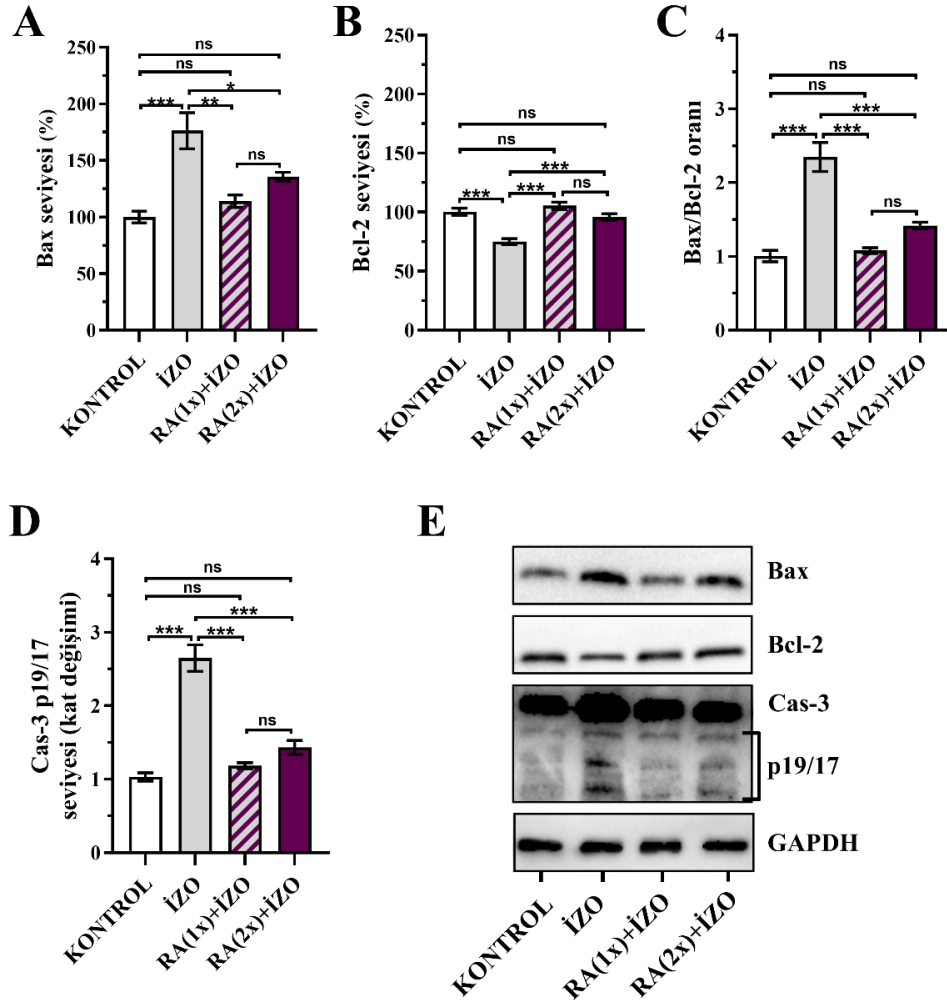
Tek anestezi (İZO₁) P7'de %1.5 izofluran uygulaması ile, tekrarlı anestezi (İZO₃) ise P7+9+11'de %1.5 izofluran uygulaması ile gerçekleştirildi. Anestezi, 3 saat boyunca oksijenli (%30) hava içerisinde verildi. Bu nedenle, kontrol gruplarına belirtilen günlerde %30 O₂ içeren hava verildi (tek anestezi kontrolü O₁, tekrarlı anestezi kontrolü O₃). Kontrol ve deney grubuna ait dokular Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde elde edildi. Beynin hipokampus, serebellum ve korteks bölümlerinde İZO'nun hasar verici etkileri Hematoksilen-Eozin (HE) boyama ve Western blot (WB) ile araştırıldı (Şekil 4.1). HE boyaması sonrası tek sefer ve tekrarlı izofluran uygulanan ratların hipokampus, serebellum ve korteks bölgelerindeki hücrelerde hücre büzülmesi, hücre-hücre temasının kaybı, piknotik nükleuslar, sitoplazmik yoğunlaşma ve birçok boş vezikül içeren apoptotik hücre profilleri daha çok görüldü (Şekil 4.1A). Bununla birlikte, İZO₁'e göre, İZO₃ ($P<0.001$) grubunun beyin bölümlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla apoptotik hücre profili tespit edildi. Ayrıca en çok hasar alan bölgenin hipokampus olduğu görüldü. WB analizinde (Şekil 4.1B), rat beyinleri 4 kısma (hipokampus, serebellum, parietal korteks ve frontal korteks) ayrılarak incelendi. O₁ ve O₃ gruplarına göre sırasıyla İZO₁ ve İZO₃ gruplarında Bax/Bcl-2 oranının, kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 fragment seviyelerinin istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca İZO₁ grubuna göre, İZO₃ grubunda apoptotik yanıtlar istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti. Ek olarak, HE boyama sonuçlarına benzer şekilde yüksek apoptotik profile sahip beyin bölümünün hipokampus olduğu belirlendi. HE ve WB analizlerine ait istatistiksel değerlendirme (Şekil 4.1C), İZO'nun tekrarlı uygulamasının daha yüksek hasara yol açtığını ve en fazla hasarın hipokampusta olduğunu gösterdi. Bu nedenle doktora tezi kapsamında P7+9+11'de %1.5 İZO anestezi uygulamasına ve rosmarinik asitin koruyucu etkisinin ise hipokampus beyin bölümünde araştırılmasına karar verildi.



Şekil 4.1: İzofluran (İZO) anestezisi pilot çalışması sonuçları. İZO'nun hipokampus, serebellum ve korteks beyin bölümlerinde hasar verici etkisinin (A) hematoxilen-eozin (HE) boyama ile (B) protein seviyelerinde western blot (WB) ile değerlendirilmesi. (C) HE ve WB analizlerine ait istatistiksel analiz grafikleri. (ns – “not significant”; *aynı beyin bölümüne ait grupların # ise farklı beyin bölümlerine ait grupların karşılaştırmasını gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$). Cas: kaspaz.

4.1.2. Rosmarinik Asit Uygulamasına Ait Pilot Çalışma Sonuçları

Rosmarinik asitin (RA) tekrarlı izofluran anestezine karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan pilot çalışmada 25 mg/kg [RA(1x)] ve 50 mg/kg [RA(2x)] konsantrasyonlarında uygulama yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.2’de verildi. Sadece İZO uygulaması yapılan grupta diğer bütün gruplara göre Bax/Bcl-2 oranı ile aktif kaspaz3 seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış belirlendi. Bu protein yanıtları açısından, RA uygulaması alan ratlar kontrole göre anlamlı bir fark göstermezken, sadece İZO uygulanan gruplara göre apoptotik belirteç seviyelerin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Bununla birlikte RA(1x) ile RA(2x) grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu bağlamda ilerleyen çalışmalarda ratlara 25 mg/kg RA konsantrasyonunun uygulanmasına karar verildi.

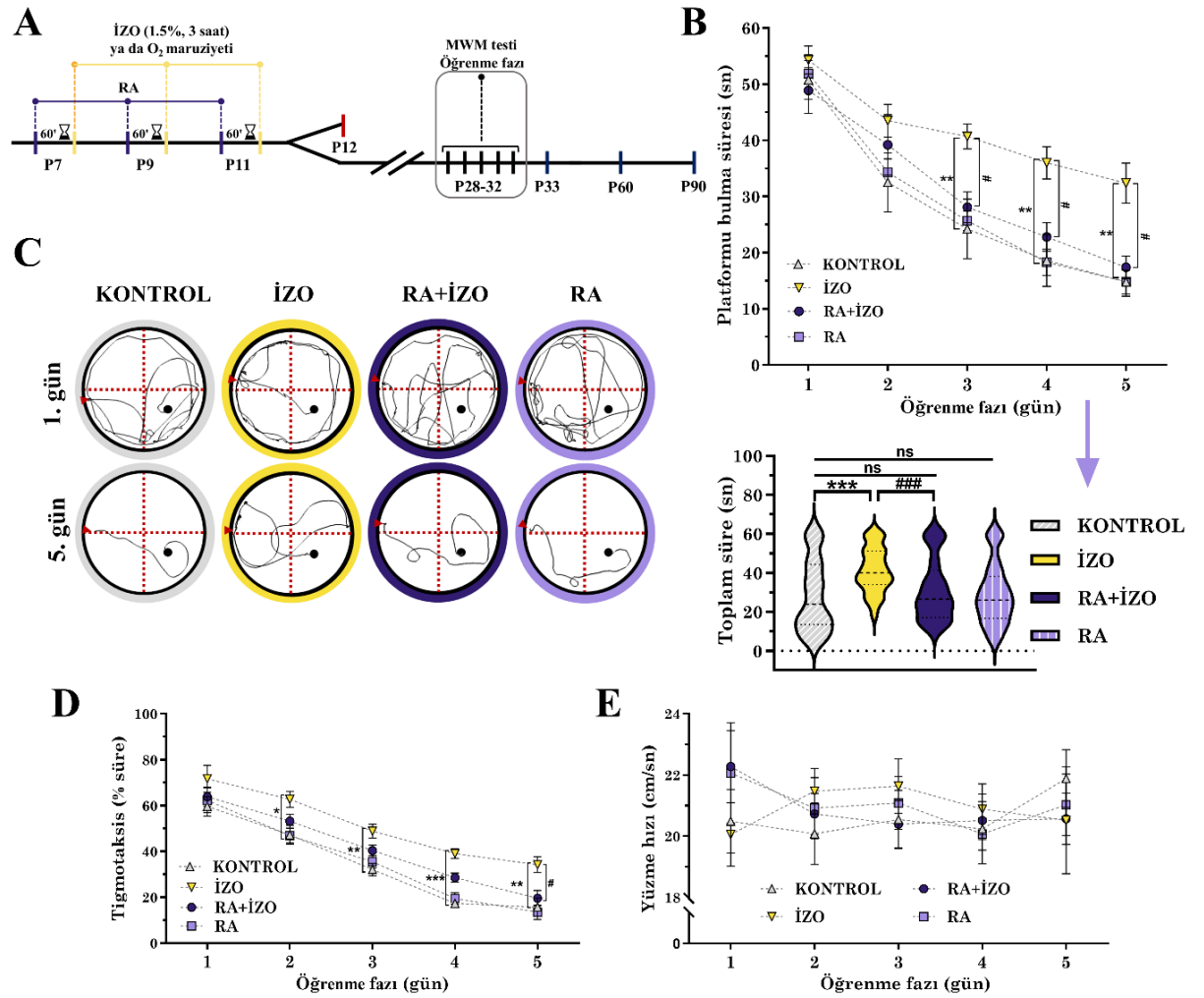


Şekil 4.2: Rosmarinik asit uygulamasına ait pilot çalışma sonuçları. Hipokampus beyin bölümünde gerçekleştirilen protein izolasyonu sonrasında (A) Bax seviyesi, (B) Bcl-2 seviyesi (C) Bax/Bcl-2 oranı ve (D) aktif kaspaz-3 (Cas-3 p19/17) seviyesi (E) western blot analizi ile değerlendirildi. (ns – “not significant”; *gruplar arası kıyaslamayı gösterir; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

4.2. MORRİS SU LABİRENTİ (MWM) DENEYLERİNE AİT SONUÇLAR

4.2.1. Morris Su Labirenti Öğrenme Fazı Sonuçları

Tezin bu aşamasında bütün deney gruplarının öğrenme yetenekleri 28 günlük ratlara 5 gün boyunca, günde 4 deneme olacak şekilde MWM testi uygulanarak (Bölüm 3.5) değerlendirildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) öğrenme üzerine koruyucu etkilerinin P28-32’de Morris su labirenti (MWM) testi ile değerlendirilmesi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B)** Kaçış platformunu bulma süresi. **(C)** Havuz içerisinde yüzme rotaları. **(D)** Tigmotaksis yüzdeleri. **(E)** Yüzme hızları. (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$).

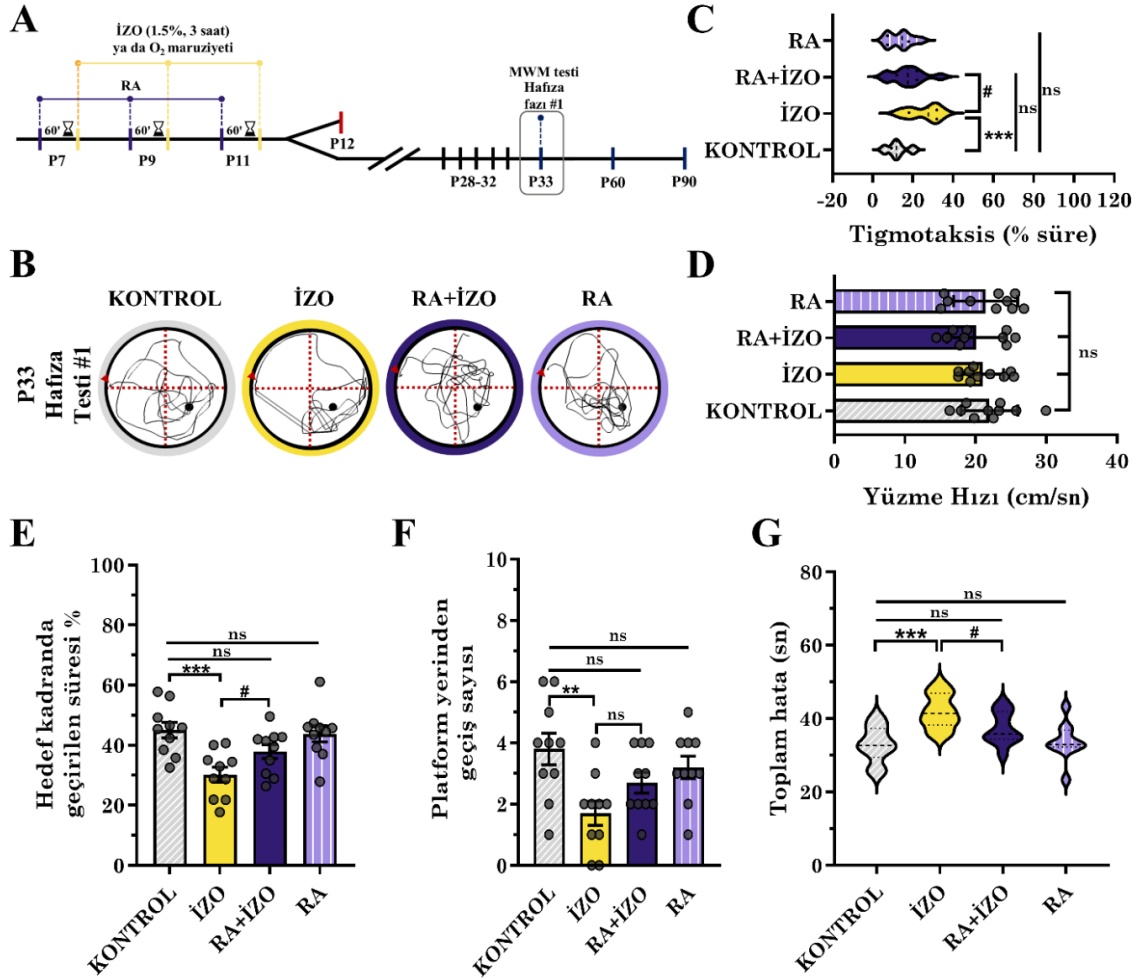
Ratlar, 1. günde kaçış platformunu ya bulamadı ya da birbirlerine yakın sürelerde buldu; dolayısıyla gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. 3. günde gruplar arasında istatistiksel farklılıklar görülmeye başlandı; KONTROL ile İZO grubu arasında ($P=0.0041$) ve RA+İZO ile İZO grubu arasında ($P=0.0462$) önemli bir farklılık tespit edildi. 4. ile 5. deneme ve öğrenme günlerinde platformu bulma süreleri açısından gruplar arasındaki fark büyüdü. 5. günde KONTROL, RA ve RA+İZO grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, İZO grubunun hem KONTROL grubuna (2.19-kat, $P=0.002$) göre hem de RA+İZO grubuna (1.86-kat, $P=0.011$) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde platformu daha geç bulduğu tespit edildi (Şekil 4.3B). Deney gruplarının yüzme rotaları incelendiğinde 1. deneme gününde benzer rotalar çizerken, 5. günkü denemelerde KONTROL, RA ve RA+İZO gruplarındaki ratların kaçış platformuna doğrudan yüzdüğü belirlendi. İZO grubunun ise havuzun kenarlarında daha çok dolanarak platformu bulduğu tespit edildi (Şekil 4.3C). Öğrenme fazında bir kaygı göstergesi olan tigmotaksisin bütün deneklerde 1. günde yüksek olduğu ve ilerleyen günlerde tüm ratlarda azaldığı tespit edildi. Fakat 5. günde, İZO grubundaki ratların hem KONTROL grubuna (2.55-kat, $P=0.002$) göre hem de RA+İZO grubuna (1.75-kat, $P=0.019$) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde tigmotaktik davranış sergilediği belirlendi (Şekil 4.3D). Yüzme hızı açısından ise gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (Şekil 4.3E).

4.2.2. Morris Su Labirenti Hafıza Fazı Sonuçları

Ratların hafızalarının test edildiği bu aşamada, üç farklı zamanda MWM testi gerçekleştirildi. Erken, orta ve geç aşama hafıza testleri sırasıyla P33, P60 ve P90'da yapıldı.

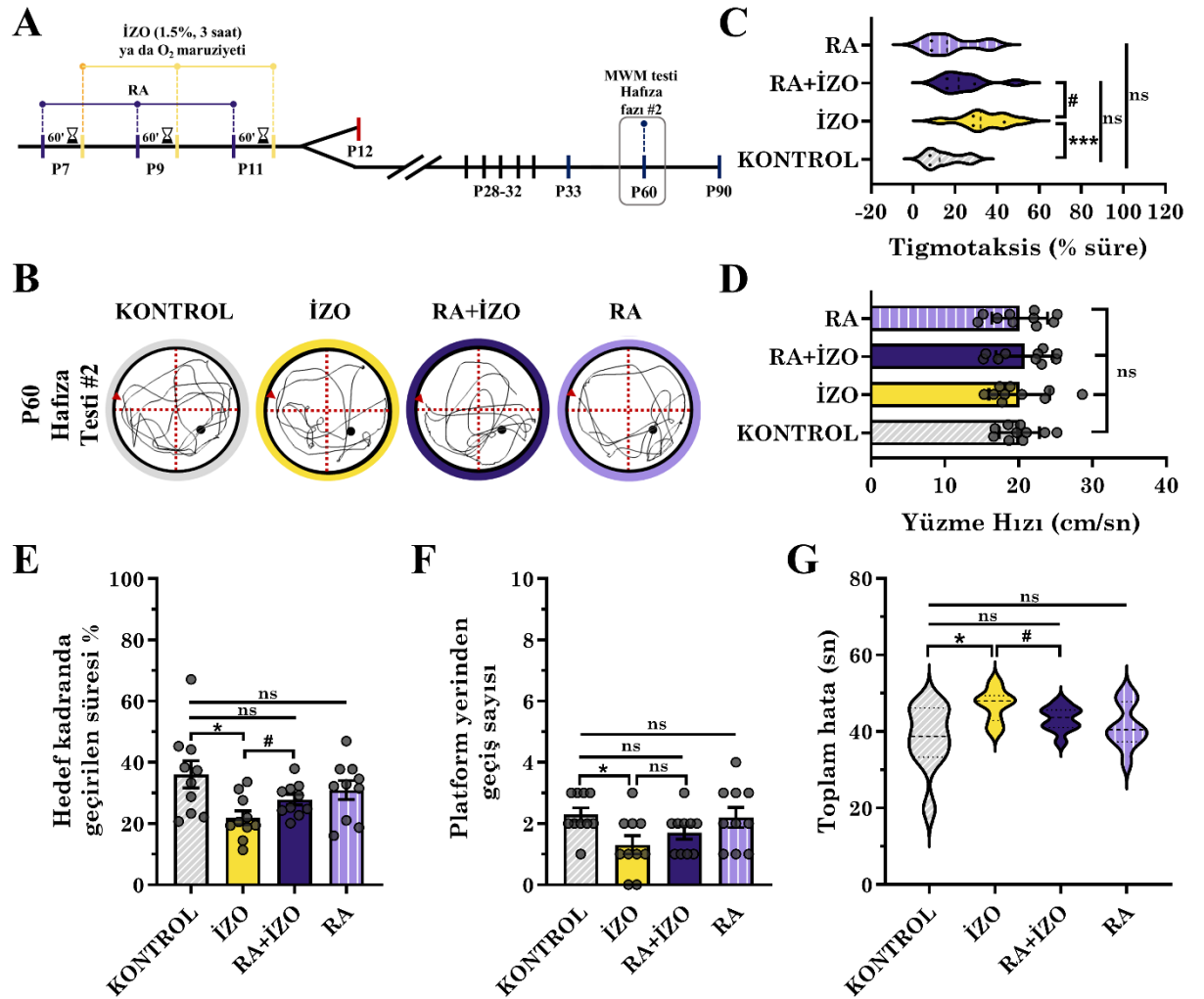
Kısa süreli hafızadaki değişimi görmek için P33'te MWM testi ile tigmotaksis, yüzme hızı, eski platform alanından geçiş sayısı, hedef kadranda ve dışında geçirilen süre parametreleri değerlendirildi (Şekil 4.4). KONTROL, RA ve RA+İZO gruplarındaki ratların, hedef kadranda ve eski kaçış platformunun bulunduğu yere yakın bölgelerde yüzdükleri görüldü. İZO grubu ratların havuz kenarlarında ve platform alanının daha uzağında yüzdüğü belirlendi (Şekil 4.4B). İZO grubunun en yüksek tigmotaksis oranına sahip olduğu ve hem KONTROL grubuna göre 2.07-katlık ($P<0.001$) hem de RA+İZO grubuna göre 1.44-katlık ($P=0.042$) artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.4C). Bununla birlikte KONTROL, RA ve RA+İZO grupları arasında tigmotaktik davranış bakımından anlamlı bir fark yoktu. Yüzme hızları değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı

belirlendi (Şekil 4.4D). Sadece izofluran alan ratlar hedef kadranda daha az bulunurken, rosmarinik asit uygulanan ratlar ile KONTROL grubundaki ratların hedef kadranda daha fazla süre geçirdiği belirlendi. Bu farkın İZO grubu ile sırasıyla KONTROL ($P<0.001$) ve RA+İZO ($P=0.038$) grupları arasında göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu sapandı (Şekil 4.4E). Eski platform yerinden grupların geçiş sayıları incelendiğinde KONTROL grubunun geçiş sayısının İZO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğu görüldü. RA+İZO ve İZO grupları arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4F). Ayrıca her bir grubun hedef kadranda bulunmasını ifade eden toplam hatanın, İZO grubunda en yüksek değere ulaştığı olduğu tespit edildi (Şekil 4.4G).



Şekil 4.4: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P33'te Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B)** Havuz içerisinde yüzme rotaları. **(C)** Tigmotaksis yüzdeleri. **(D)** Yüzme hızları. **(E)** Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. **(F)** Eski platform yerinden geçiş sayısı. **(G)** Hedef kadranda geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$).

Deney ve kontrol gruplarında uzun süreli hafızadaki değişimleri değerlendirmek için ilk olarak P60'ta MWM hafıza testi gerçekleştirildi (Şekil 4.5). Yüzme rotaları, RA ve RA+İZO gruplarındaki ratların hem hedef kadranda hem de eski platform yerine yakın yüzdüklerini gösterdi. Sadece İZO alan ratların hedef kadranda dışında daha çok zaman harcadığı tespit edildi (Şekil 4.5B). İZO grubundaki ratların tigmotaksis yüzdesi, hem KONTROL (2.31-kat, $P<0.001$) hem de RA+İZO grubuna göre (1.44-kat, $P=0.049$) istatistiksel açıdan anlamlı seviyede yüksekti (Şekil 4.5C). Kısa süreli hafıza değerlendirmesinde olduğu gibi MWM hafıza fazının orta aşamasında da ratların yüzme hızları birbirlerine benzerdi (Şekil 4.5D).

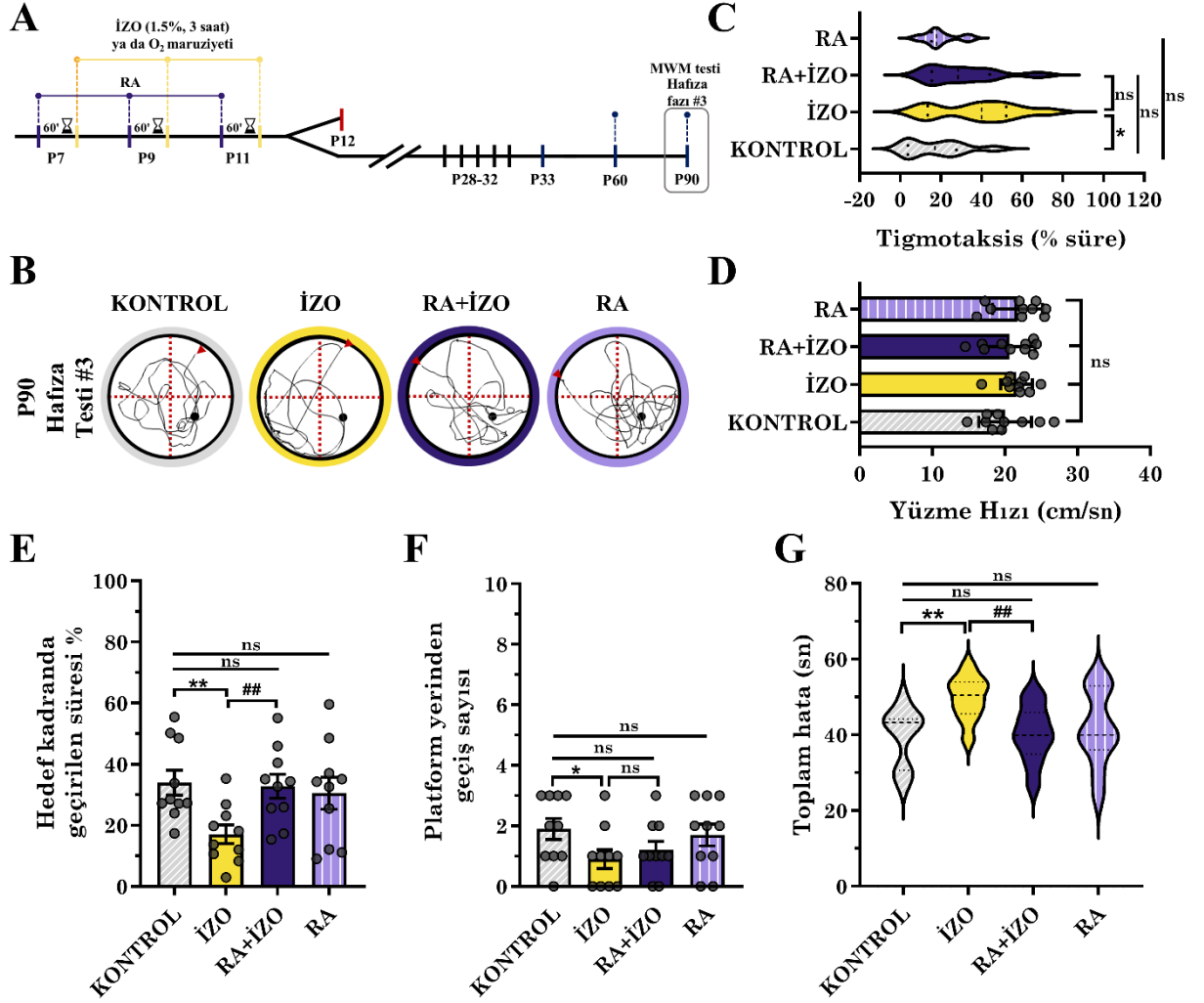


Şekil 4.5: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P60'ta Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B)** Havuz içerisinde yüzme rotaları. **(C)** Tigmotaksis yüzdeleri. **(D)** Yüzme hızları. **(E)** Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. **(F)** Eski platform yerinden geçiş sayısı. **(G)** Hedef kadranda dışarıda geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$).

Ayrıca, P60'ta, KONTROL ve RA+İZO gruplarındaki ratların, İZO grubundakilere kıyasla hedef kadranda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunduğu görüldü. Ayrıca RA ve KONTROL grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4.5E). Uzun süreli hafıza fazında ratların platformdan geçiş sayısı incelendiğinde en fazla geçiş yapan KONTROL grubu ile en az geçiş yapan İZO grubuna ait sonuçlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu ($P=0.014$) belirlendi. Bununla birlikte, diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.5F). Ayrıca, İZO grubundaki ratların diğer gruplara (KONTROL ve RA+İZO) göre hedef kadranda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunduğu belirlendi (Şekil 4.5G).

Ratların uzun süreli hafızanın değerlendirilmesinde ikinci olarak ise P90'da MWM hafıza testi gerçekleştirildi (Şekil 4.6). Yüzme rotaları incelendiğinde, İZO grubunun P90'da daha çok hedef kadranda yüzdüğü, diğer grupların ise hedef kadranda içerisinde daha fazla zaman harcadığı belirlendi (Şekil 4.6B). İZO grubundaki ratlarda tigmotaksis hareketinin KONTROL grubuna göre 2.15-kat daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P=0.02$) tespit edildi. Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.6C). Ratların yüzme hızı tüm gruplarda değerlendirildiğinde, P90'da gruplar arasında bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.6D).

P90'da hedef kadranda geçirilen süre açısından yapılan analizde, sadece izofluran uygulanan ratların hedef kadranda daha az bulunduğu ve hem KONTROL grubuna ($P=0.003$) hem de RA+İZO grubuna ($P=0.005$) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az süre geçirdiği saptandı (Şekil 4.6E). P90'da diğer hafıza fazlarına göre ratların platformdan geçiş sayısında azalma görüldü. En az geçiş sayısına sahip olan İZO grubunun KONTROL grubu ($P=0.047$) ile arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Şekil 4.6F). Ayrıca İZO grubu hedef kadranda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde en çok süre geçiren grup oldu. Diğer gruplar arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.6G).



Şekil 4.6: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) hafıza açısından koruyucu etkilerinin P90'da Morris su labirenti (MWM) testiyle değerlendirilmesi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B)** Havuz içerisinde yüzme rotaları. **(C)** Tigmotaksis yüzdeleri. **(D)** Yüzme hızları. **(E)** Hedef kadranda geçirilen sürenin yüzdesi. **(F)** Eski platform yerinden geçiş sayısı. **(G)** Hedef kadranda geçirilen süre (toplam hata). (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; ## $P<0.01$).

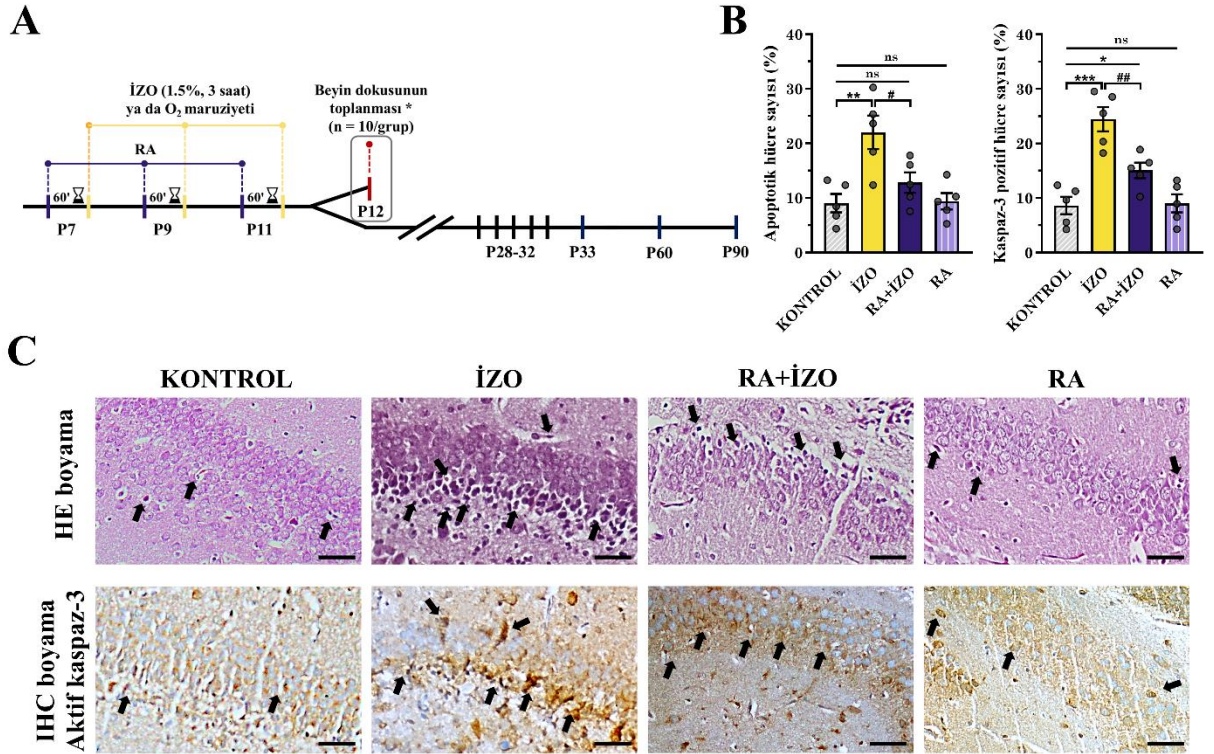
4.3. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLERE AİT SONUÇLAR

Tekrarlı izofluran uygulaması (P7+9+11) ve her anestezi uygulamasından önce rosmarinik asit ön tedavisini takiben P12'de hipokampustaki nöronlar üzerindeki hasar, HE boyama ve aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal boyaması ile değerlendirildi (Şekil 4.7).

İZO grubundaki ratların hipokampus beyin bölümünün öğrenme ve hafıza merkezi CA1 bölgesi nöronlarında hücre büzülmesi, hücre-hücre temasının kaybı, piknotik nükleus,

sitoplazmik yoğunlaşma ve çok sayıda boş vezikül belirlendi; bu değişimler apoptotik hücre profilini işaret etti (Şekil 4.7C). İZO grubunda >%20 apoptotik ve hasarlı hücre tespiti yapıldı ve bu sonuç KONTROL grubuna göre 2.44-kat daha fazlaydı. Farklı 5 alanda sayılan ve değerlendirilen hücre sonuçları, diğer gruplardaki apoptotik profili gösteren parametrelerin, İZO grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı ve daha az olduğunu gösterdi (Şekil 4.7B).

Apoptoz belirteçlerinden biri olan aktif kaspaz-3 miktarı İZO grubunda, hem KONTROL grubuna (2.84-kat; $P<0.001$) hem de RA+İZO grubuna (1.62-kat; $P=0.007$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bununla birlikte, KONTROL grubunun RA+İZO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede, daha az aktif kaspaz-3 pozitif hücre içerdiği belirlendi. RA ve KONTROL grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 4.7B-C).



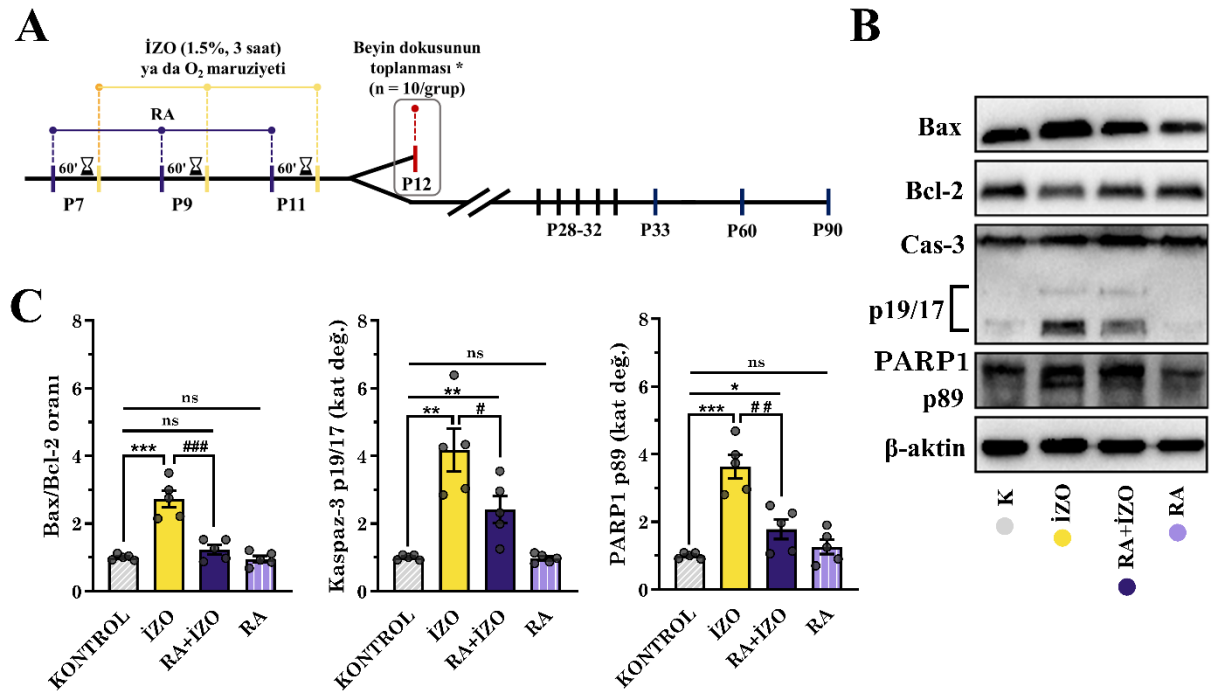
Şekil 4.7: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus CA1 bölgesindeki hasarlı ve apoptotik hücrelerin histopatolojik analizi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B-C)** HE boyama ve IHC ile aktif kaspaz-3 işaretleme sonuçları (skala bar: 50 μ m; büyütme: $\times 400$) (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$).

4.4. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR

Tekrarlı izofluran uygulamasında (P7+9+11) her anestezi uygulamasından önce rosmarinik asit ön tedavisi yapıldıktan sonra P12’de hipokampus beyin bölgesinde apoptotik, oksidatif, inflamatuvar ve hücrel stres yanıtları ile ilişkili proteinlerin seviyelerindeki değişimler Western blot analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.8-Şekil 4.11).

4.4.1. Apoptotik Yanıt ile İlişkili Analizler

P12’de toplanan hipokampus dokularında apoptoz ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler immünoyblotlama yapılarak değerlendirildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde apoptotik yanıtın Western blot yöntemiyle analizi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B-C)** Western blot ile Bax/Bcl-2 oranının, kaspaz-3 p19/17 ve PARP1 p89 fragmentleri seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.01$).

Yapılan analizlerde en yüksek Bax/Bcl-2 oranına, kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 fragment seviyelerine sahip olan grubun İZO grubu olduğu görüldü. KONTROL grubuna göre İZO grubunun apoptotik yanıtındaki artışın, Bax/Bcl-2 oranında 2.72-kat ($P < 0.001$), kesilmiş kaspaz-3 seviyesinde 4.17-kat ($P = 0.001$) ve PARP1 fragment seviyesinde 3.64-kat ($P < 0.001$)

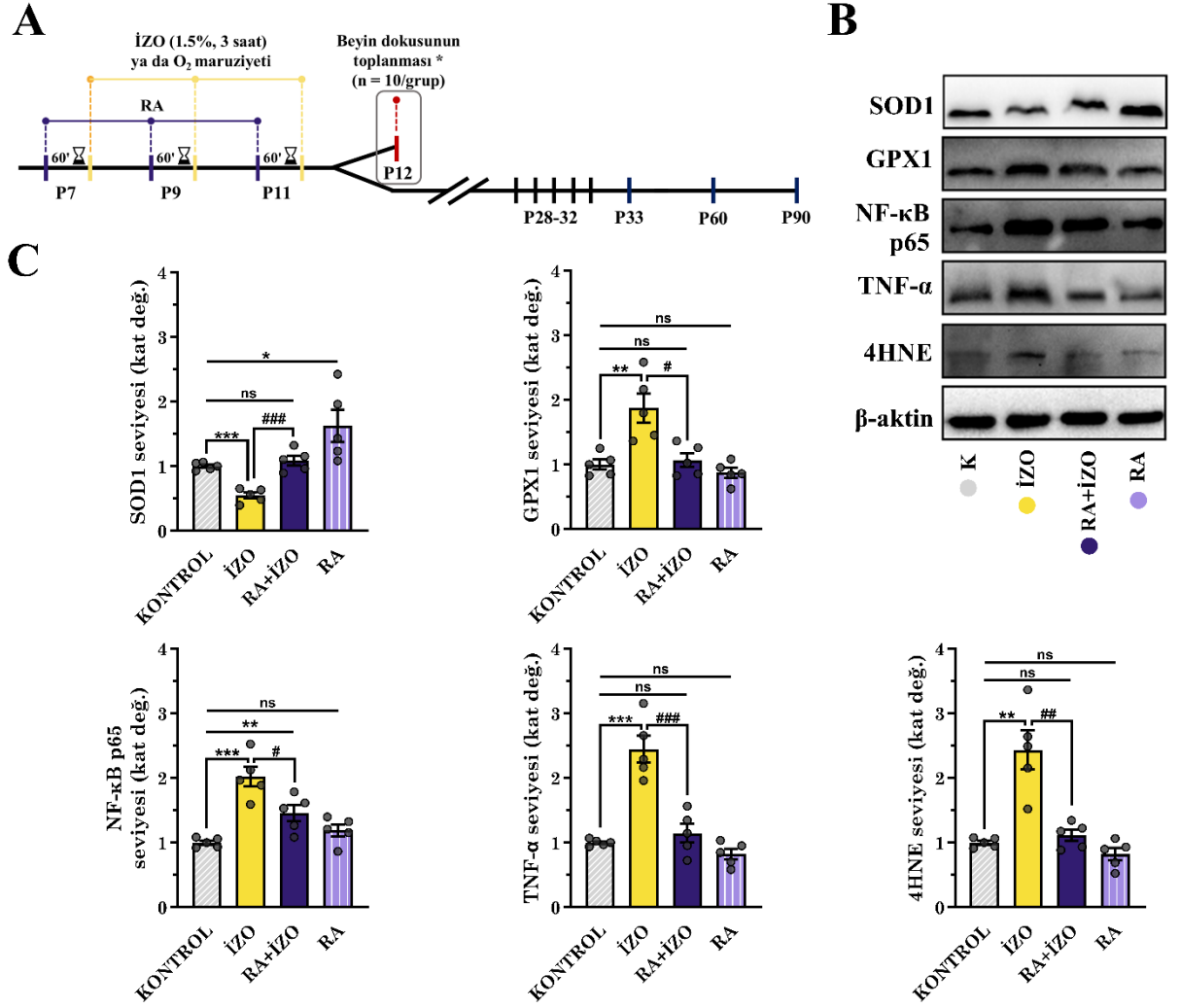
olduğu ve bu değişimlerin anlamlı olduğu saptandı. Ayrıca RA+İZO grubuna göre de İZO grubunun Bax/Bcl-2, aktif kaspaz-3 ve PARP1 fragmenti sonuçlarının, sırasıyla 2.21-kat ($P<0.001$), 1.73-kat ($P=0.046$), 2.04-kat ($P=0.003$) oranında istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. KONTROL ile RA grubu arasında incelenen proteinlerin hiçbirinde anlamlı bir fark görülmedi. KONTROL ile RA+İZO grupları karşılaştırıldığında, kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 fragment seviyeleri arasında sırasıyla; 2.41-kat ($P=0.008$) ve 1.78-kat ($P=0.029$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi (Şekil 4.8B-C).

4.4.2. Oksidatif ve İnflamatuvar Yanıt ile İlişkili Analizler

Bölüm 3.4 be Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi, P12'de toplanan hipokampus dokularında oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkili bazı proteinlerin ekspresyon seviyeleri immünolojik analizlerle değerlendirildi (Şekil 4.9).

Oksidatif stresin değerlendirilmesinde antioksidan enzimlerden SOD1 ve GPX1'in seviyelerine ek olarak, lipid peroksidasyonuna ve ROS miktarına bağlı olarak oluşan protein hasar kalıntılarından 4HNE (4-Hidroksinonenal) miktarı araştırıldı. İnflamasyon hakkında fikir edinmek için ise NF- κ B p65 alt ünitesi miktarına ve TNF- α seviyesine bakıldı (Lee ve diğ., 2015).

SOD1 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında İZO grubunda diğer gruplara (KONTROL grubuna göre 1.82-kat, $P<0.001$; RA+İZO grubuna göre 1.98-kat $P<0.001$) göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş saptandı. KONTROL ve RA+İZO grupları arasında anlamlı bir fark görülmezken, RA grubunda kontrole göre 1.63-katlık ($P=0.036$) anlamlı bir artış tespit edildi. GPX1 ekspresyon seviyelerinin ise sadece İZO grubunda (KONTROL grubuna göre $P=0.007$; RA+İZO göre $P=0.012$) anlamlı artış gösterdiği belirlendi. Oksidatif hasarın önemli bir belirteci olan 4HNE bakiyeli protein seviyesinin de (KONTROL grubuna göre 2.44-kat, $P=0.002$; RA+İZO'ya göre 2.20-kat, $P=0.003$) sadece İZO grubunda artış gösterdiği belirlendi. İnflamasyon belirteçleri olan NF- κ B p65 (KONTROL grubuna göre 2.02-kat, $P<0.001$; RA+İZO'ya göre 1.37-kat, $P=0.021$) ve TNF- α (KONTROL grubuna göre 2.45-kat, $P<0.001$; RA+İZO'ya göre 2.13-kat, $P<0.001$) ekspresyon seviyelerinin İZO grubunda istatistiksel açıdan anlamlı seviyede arttığı saptandı. KONTROL grubuna göre RA+İZO grubunda NF- κ B p65 seviyesinde 1.46-katlık ($P=0.008$) anlamlı bir artış görülürken, TNF- α seviyesinde ise anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 4.9B-C).

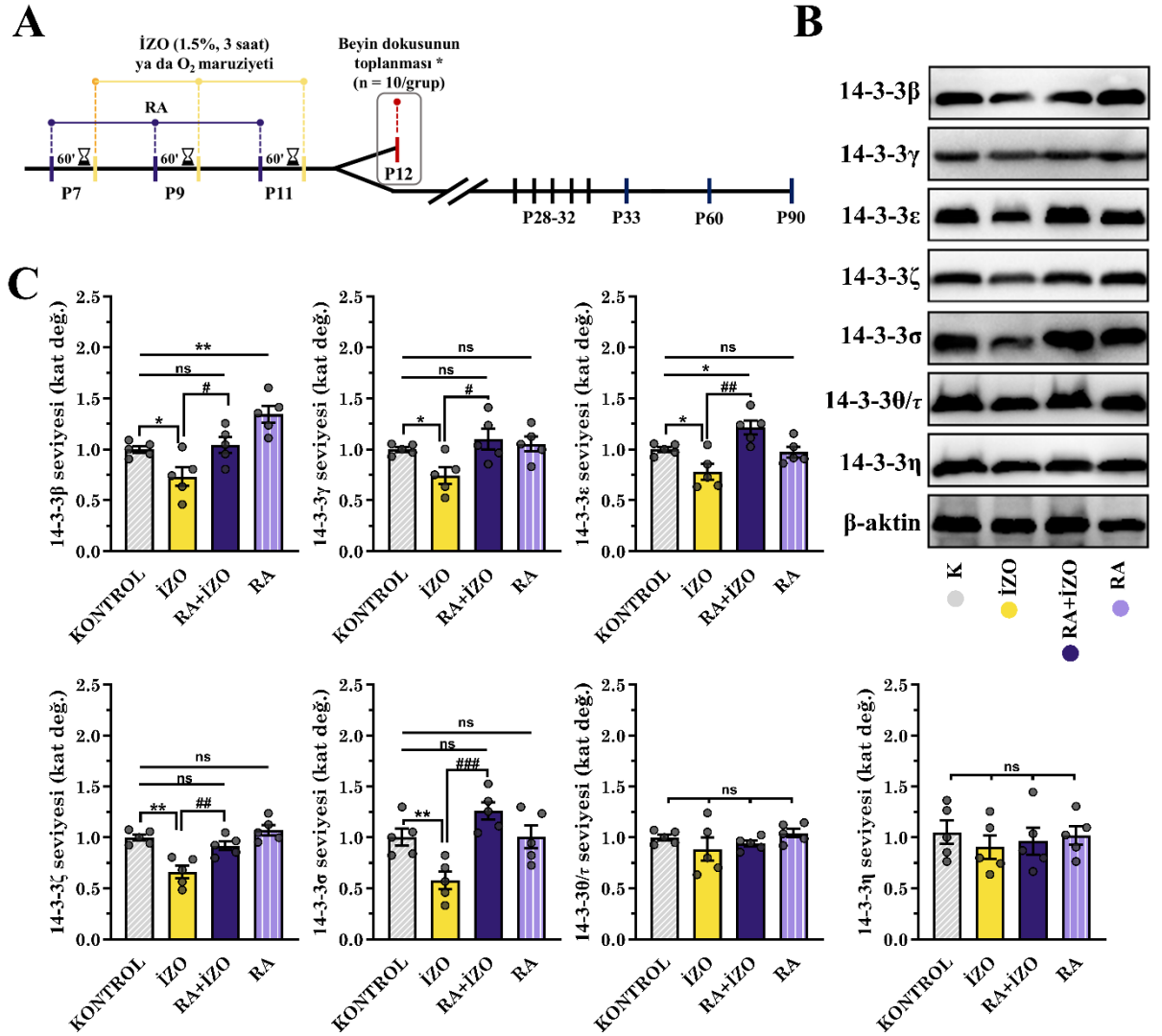


Şekil 4.9: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde oksidatif ve inflamatuvar yanıtın western blot yöntemiyle analizi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B-C)** Western blot ile SOD1, GPX1, NF-κB p65, TNF-α ve 4HNE seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.01$).

4.4.3. Stres Proteinlerinin Ekspresyon Seviyelerine İlişkin Analizler

P12’de toplanan hipokampus dokularında (bkz. Bölüm 3.4) hücresel stres yanıtları ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler immünolojik analizlerle değerlendirildi (Şekil 4.10). Hücresel stres yanıtlarının değerlendirilmesinde Hsp’lerin transkripsiyonundan sorumlu HSF1’in fosforile seviyeleri ile Hsp90, Hsp70 ve Hsp60 proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler araştırıldı (McClintick ve diğ., 2011; Vizcaychipi ve diğ., 2011). Ayrıca stres proteini aile üyelerinden olan 14-3-3 proteinlerinin 7 izoformunun ekspresyonlarındaki değişimler de incelendi (Cornell ve Toyo-Oka, 2017).

anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi. RA+İZO grubunda 14-3-3 β , γ , ϵ , ζ ve σ protein ekspresyon seviyeleri, İZO grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı (sırasıyla; $P=0.034$, $P=0.023$, $P=0.003$, $P=0.009$ ve $P<0.001$) seviyede yüksekti. Bununla birlikte, 14-3-3 θ/τ ve η izoformlarının ekspresyon seviyeleri bütün gruplarda benzerdi. RA+İZO grubunun 14-3-3 ϵ izoform seviyesi KONTROL'e göre istatistiksel olarak anlamlı olan 1.21-katlık ($P=0.02$) artış gösterdi. Ayrıca RA grubundaki 14-3-3 β protein seviyesindeki 1.34-katlık ($P=0.005$) artış KONTROL grubuna göre oldukça anlamlı bir fark ortaya koydu (Şekil 4.11B-C).



Şekil 4.11: Tekrarlı izofluran (İZO) anestezi uygulamasına karşı rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkilerinin erken aşama (P12) değerlendirilmesinde hipokampus beyin bölgesinde 14-3-3 protein seviyelerinin western blot yöntemiyle analizi. **(A)** Çalışma zaman çizelgesi. **(B-C)** Western blot ile 14-3-3 izoformlarının (β , γ , ϵ , ζ , σ , θ/τ ve η) seviyelerinin analiz sonuçları (ns – “not significant”; *KONTROL grubuna göre kıyaslamayı; # İZO ve RA+İZO arasındaki karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$; ## $P<0.05$, ### $P<0.01$, #### $P<0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genel anestezi, cerrahi işlem uygulanacak hastalarda; bilinçsizlik, hareketsizlik ve analjezi oluşturmak için bir veya birden fazla ilacın kullanılması olarak tanımlanabilir. Genel anestezi ile bilinçsizliğe ve otonom kontrol sistemlerinin işlevlerinde azalmaya neden olunarak anestezi altındaki hastaların verbal, taktıl ve ağırlı uyaranlara yanıt verememeleri sağlanır (Dodds, 1999). Genel anestezi vücutta birçok fizyolojik değişikliğe neden olabilir ve uygun bir şekilde gerçekleştirilmediğinde potansiyel olarak morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilir (Albin ve NIKodemski, 2018). Anestezi ve monitörizasyon yöntemlerinde zaman içinde meydana gelen gelişmeler ve anestezi uygulamasının deneyimli anestezi uygulayıcıları tarafından gerçekleştirilmesi gibi faktörler sayesinde, klinik pratikte anestezi etkili ve güvenli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Stiegler ve Ruskin, 2012).

Genel anestezinin bilişsel bozulma üzerindeki etkisi tartışmalı ve karmaşıktır. Artan deneysel ve klinik çalışma sonuçları, anestezi maruziyeti ile geçici ya da uzun vadeli nörobilişsel bozuklukların gelişimi veya normal preoperatif bilişsel işlevi olan hasta popülasyonunda demans gelişimi arasında bağlantılar öne sürmektedir. Cerrahi ve anestezi ile kognitif disfonksiyon arasındaki bağlantının daha detaylı olarak aydınlatılması klinik pratiği yönetmede kritik öneme sahiptir (Belrose and Noppens, 2019). Özellikle pediatrik yaş grubundaki hastaların erişkinlere göre sahip oldukları farklı fizyolojik özellikler, daha yüksek anestezi riski ile ilişkilidir ve nörogelişimsel sürecin aldığı hasara bağlı olarak ileri yaşlarda bilişsel bozukluk görülme riski de yüksektir. Birçok hayvan deneyi ve insan çalışmaları, yenidoğan ve bebeklik dönemlerinde tekrarlayan veya uzun süreli anestezi kaynaklı toksisite nedeniyle yaşamın ilerleyen dönemlerinde davranışsal ve öğrenme bozukluklarına işaret etmektedir (Wilder ve diğ., 2009; Flick ve diğ., 2011; Walters ve Paule, 2017; Feng ve diğ., 2020).

FDA, üç yaşından küçük çocukların üç saatten uzun süreli veya tekrarlayan anestezi uygulamaları sonrası artmış öğrenme, hafıza ve davranış değişiklikleri riski ile karşı karşıya olduklarını bildirmiştir (FDA, 2017). Bu veri üzerine başlatılan geniş ölçekli çalışmaların başında GAS (“General Anesthesia Spinal”) ve PANDA (“Pediatric Anesthesia Neurodevelopmental Assessment”) gelmektedir. GAS çalışmasında iki yaşın altındaki

çocuklarda bir saatin altındaki genel anestezi uygulamasının spinal anestezi ile karşılaştırıldığında, nörogelişimsel sonuçlar açısından olumsuz etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır (McCann ve diğ., 2019). Benzer şekilde PANDA çalışması da tek sefer anestezi uygulamasının üç yaş altı çocuklarda nörokognitif disfonksiyon açısından risk oluşturmadığını bildirmiştir (Sun ve diğ., 2016). Diğer önemli bir çalışma olan MASK (“Mayo Anesthesia Safety in Kids”) sonuçları ele alındığında ise tekrarlayan anestezi uygulamasının çocuklarda öğrenme ve davranışlarla ilişkili problemlere neden olduğu vurgulanmaktadır (Warner ve diğ., 2018). Bazı retrospektif ve prospektif çalışmaların sonuçları da 18 yaş altı anestezi maruziyeti olan çocuklarda öğrenme yetersizliği, dikkat eksikliği, davranışsal anormallikler gibi kognitif bozuklukların görülebileceğini göstermişlerdir (DiMaggio ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2014; Grabowski ve diğ., 2021). Benzer şekilde, büyük çaplı farklı bir retrospektif çalışmanın sonuçları da tekrarlayan genel anestezi uygulanan dört yaş altı çocukların okuma, yazma yeteneklerinin ve matematik zekalarının genel anestezi almamış çocuklarla kıyaslandığında iki kat daha fazla oranda olumsuz etkilendiğini göstermiştir (Wilder ve diğ., 2009). FDA’nın önerileri ve bu çalışmaların sonuçları doğrultusunda yaşamı tehdit eden durumların tedavisinde gerekli cerrahilerin ertelenmesinin önerilmediği, fakat elektif cerrahilerin zamanlaması konusunun aile ve hastanın doktoru tarafından tartışılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Burada üzerinde durulması gereken konu bu cerrahi müdahalenin tek sefer anestezi uygulaması mı gerektirdiği yoksa birden fazla anestezi uygulaması mı gerektirdiğidir. Cerrahi ve anestezi süresi de bir diğer önemli konudur. Çünkü anestezi ile ilişkili nörokognitif bozukluklar açısından asıl problemin tekrarlayan ve/veya uzamış anestezi olduğu vurgulanmıştır (Grabowski ve diğ., 2021).

Anestezi bağlantılı kognitif disfonksiyon ile en fazla ilişkilendirilen ajanlar inhalasyon anestezikleridir ve bu anestezi grubundan sevofluran, desfluran ve izofluran günlük anestezi pratiğinde en sık kullanılan anesteziklerdir (Apai ve diğ., 2021). İnsan epidemiyolojik çalışmaları, yaşamın erken evrelerinde anesteziklere birden fazla maruz kalmanın tek bir maruziyete göre neden olduğu bilişsel bozuklukların ciddiyetini desteklemektedir (Wilder ve diğ., 2009; Flick ve diğ., 2011). İzofluran (İZO) üzerine artan kanıtlar erken doğum sonrası zamanda tekrarlı ya da uzamış maruziyetin erken evre nörotoksisite ve ileri evrede kognitif bozukluklarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Disma ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2020). Bizim de daha önce yaptığımız çalışmaların sonuçları (Demirgan ve diğ., 2021; Yılmaz ve

diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ve tez kapsamında yaptığımız pilot çalışmanın bulguları (Şekil 4.1) tekrarlanan İZO maruziyetinin nörotoksositeye ve öğrenme-hafıza bozukluklarına neden olduğunu göstermiştir. Bu doktora tez çalışmasında, pediatrik anestezi kliniğinde sıklıkla kullanılan izofluranın toksisitesi (Pradeep ve diğ., 2017; Eshetie ve diğ., 2020), tekrarlı anestezi uygulaması sonrası çalışılarak elde edilen sonuçların klinik olarak anlamlı olması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, doğum sonrası (postnatal) P7, P9 ve P11 (P+7+9+11) günlerinde rat yavrularına 3 saat süreyle 30% oksijen içeren hava karışımı içinde 1.5% İZO anestezisi uygulanmıştır.

Sinaptogenez, beyin gelişiminde ve kognisyonda rol alan önemli bir nöronal gelişim sürecidir. Sinapslar, nöronlar arasında elektriksel ve kimyasal iletme olanak sağlayan özelleşmiş hücreler arası bağlantılar olarak işlev görürler. Yeterli sinaptik aktivitenin varlığı, öğrenme ve hafıza gibi ileri kognitif fonksiyonlarda hayati önem taşımaktadır (Petzoldt ve Sigrist, 2014). Sinaptogenez, canlı gelişiminin erken dönemlerinde meydana gelmektedir ve rodentlerde postnatal 4. ve 14. günler arasında gerçekleşmektedir. Postnatal 7. günde sinaptogenezin pik yaptığı bildirilmiştir (Yon ve diğ., 2005). Bu nedenle rodent santral sinir sisteminin inhalasyon anesteziklerinin olumsuz etkilerine karşı en savunmasız dönemin postnatal 7. gün olduğu düşünülmektedir. Daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışma, P10'da tek sefer ve uzun süreli (6 saat) İZO maruziyetinin, ratların öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır (Demirgan ve diğ., 2019). Dahası P7'de başlamak üzere bir gün arayla ve toplamda üç gün İZO maruziyetinin neden olduğu kognitif bozukluk önceki çalışmalarımızda raporlanmıştır (Demirgan ve diğ., 2021; Yılmaz ve diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024). Bu bağlamda, doktora tez çalışması kapsamında izofluranın rat beyni üzerindeki olası olumsuz etkilerini tespit etmek amacıyla, mekansal öğrenme ve hafıza ile ilişkili sinaptogenezin hızlandığı aşama olan P7'de İZO uygulaması ile birlikte 3 tekrarlı anestezi (P7-9-11. günlerde) uygulamasının yapılmasına karar verildi. Kemirgenlerde sinaptogenez sürecinin büyük çoğunluğu P14'te tamamlandığından, tekrarlanan anestezi uygulamasının P14'ten önce tamamlanmasına önem verildi (Rice ve Barone, 2000; Li M. ve diğ., 2010). Ayrıca, hızlı sinaptogenez dönemini temsil eden P7-P11 aralığı (Zhou ve diğ., 2021), anestezi uygulama günleri olarak özellikle tercih edildi.

İZO anestetiğinin dozu ile uygulama süresi önceki raporlarımıza (Demirgan ve diğ., 2021; Yılmaz ve diğ., 2023; Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ve diğer hayvan çalışmalarına (Johnson ve

diğ., 2008; Maloney ve diğ., 2019) dayanmaktadır. Bu verilere dayanarak, göre İZO'nun uygulama dozu %1.5 ve süresi ise 3 saat olarak belirlendi. Bu değer ayrıca İZO'nun klinik olarak anlamlı aralığına giren MAC ("minimum alveolar concentration") değerine de karşılık gelmektedir (Chen ve diğ., 2015; Cooter ve diğ., 2020). İZO uygulama süresi olarak belirlenen 3 saat, FDA (2017) bildirince de desteklenmektedir; burada küçük çocuklarda nörogelişim açısından olası risk oluşturan uzun süreli anestezi maruziyetlerinin ≥ 3 saatlik süreleri içerdiği belirtilmektedir. Bu aşamada, tez kapsamında uygulanan izofluran anestetiğinin doz ve uygulama süresi açısından da klinik olarak anlamlı olması amaçlanmıştır. Ek olarak, İZO uygulaması %30 oksijen içeren hava karışımı içinde yapılmış olup, çalışılan oksijen konsantrasyonu yüksek oksijen seviyelerine bağlı zararlı etkilerden kaçınmak için toksik olmayan bir aralık (≤ 50) olarak tercih edildi (Demirgan ve diğ., 2019; Maloney ve diğ., 2019).

Beynin hipokampus bölgesi öğrenme ve hafıza süreçlerinin merkezinde yer alır. Hipokampusun CA1 bölgesi nöronlarının hasar alması hipokampusla ilişkili öğrenme ve hafıza sorunlarının önemli bir nedenidir (Roux ve diğ., 2021). Bu doktora tez çalışmasında, Morris su labirenti ("Morris Water Maze", MWM) deneyleri sonucuna göre, erken dönem tekrarlı İZO maruziyetinin, öğrenme (Şekil 4.3) ve hafıza (erken, orta ve uzun dönem) bozukluklarına (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) neden olduğu görülmüştür. Öğrenme fazında, tüm gruptaki ratların platformun yerini öğrendiği fakat İZO grubundaki ratların daha zor öğrendiği belirlenmiştir. Hafıza testleri ise İZO'ya maruz kalan ratların, hedef kadranda daha az bulunduğu ve eski platform yerinden diğer gruplara göre daha az geçtiğini göstermiştir. Üstelik test edilen üç farklı zamanda da (P33, P60, P90) tekrarlı İZO'ya maruz kalan ratların öğrenme fazındaki platformun yerini hatırlamaması ve bu alanda yeterince yüzmemesi, İZO maruziyetinin yenidoğan beynine olumsuz etkisinin uzun vadeli olduğunu ortaya koymuştur (Murphy ve Baxter, 2013; Maloney ve diğ., 2019). Ek olarak hem öğrenme hem de hafıza fazlarında gruplar arası ratların yüzmeye hızlarında fark görülmemesi, motor fonksiyonların etkilenmediğini ve İZO kaynaklı hasarın öğrenme ve hafıza kabiliyetleri üzerinden olduğunu desteklemiştir (Liu ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2018).

Sunulan doktora tez çalışmasında, histopatolojik (Şekil 4.7) ve western blot analizleri (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) İZO kaynaklı bilişsel işlev bozukluklarının kaynağının, apoptoz, artmış oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili olduğunu göstermiştir. Akut fazda (P12) hipokampus

CA1 bölgesinde önemli miktarda apoptotik (HE analizi) ve kaspaz-3 pozitif hücre (IHC analizi) tespit edilmiştir. Apoptotik belirteçlerle yürütülen immünoiblotlama analizleri de bunu desteklemiştir; istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış Bax/Bcl-2 oranına ek olarak kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 fragmenti seviyeleri belirlenmiştir. Destekleyici olarak, pek çok çalışma İZO maruziyetinin nöroapoptoza neden olduğunu (Liang ve diğ., 2010; Istaphanous ve diğ., 2011; Kodama ve diğ., 2011; Yılmaz ve diğ., 2023) ve buna bağlı olarak da öğrenme ve hafıza bozukluklarına yol açtığını göstermiştir (Zhao ve diğ., 2020; Demirgan ve diğ., 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024). Çünkü, yüksek miktarda indüklenen apoptoz nöronal gelişimi olumsuz yönde etkileyerek yaşamın ilerleyen dönemlerinde davranışsal değişikliklere yol açabilmektedir (Hanson ve diğ., 2015). Bu tez çalışması kapsamında, İZO maruziyetine bağlı olarak SOD1 seviyelerinde anlamlı bir azalışa karşın GPX1 seviyelerinde artış görülmüştür. Bu enzimler, oksidanlara yanıtta rol alarak serbest radikal kaynaklı hasarı azaltabilmektedir. Ancak enzimin ekspresyon seviyesindeki değişim her zaman aktivitesiyle doğru orantılı olmayabilir ve daha net bir çıkarım için aktivite test sonuçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, İZO maruziyetinin GPX4 seviyelerinde (Xia ve diğ., 2019) ve SOD aktivitesinde (Wang ve diğ., 2017; Sun ve diğ., 2019) azalmaya yol açtığı yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Sonuçlar azalan SOD1 seviyelerinin yanında, GPX1 seviyelerindeki artışın; ROS ürünlerinin uzaklaştırılmasında yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, oksidatif stres belirteci 4HNE ile inflamasyon göstergesi kabul edilen NF- κ B p65 ve TNF- α (Lee ve diğ., 2015) ekspresyon seviyeleri akut fazda önemli ölçüde artmıştır. Artan literatür bilgisi bu sonucu desteklemektedir. Yaşamın erken dönemlerinde gerçekleşen nöro-inflamasyonun, nöropsikiyatrik hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir (Hagberg ve diğ., 2012). IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin nöronal değişim, nöronal proliferasyon ve nörojenezi etkilediği bildirilmiştir (Das ve Basu, 2008). Özellikle, ROS kaynaklı 4HNE ürünleri, transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunda rol alırlar ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin miktarının artmasına neden olarak ikincil haberciler olarak hareket ederler (Yadav ve Ramana, 2013; Liu ve diğ., 2020). Bu şekilde anestezi-kaynaklı toksisitede öncü bir rol oynayarak (Disma ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2020), neticede apoptotik yanıtların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Zhang ve diğ., 2010; Senoner ve diğ., 2021; Ritiu ve diğ., 2022). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular İZO-indüklü toksisiteye oksidatif, inflammatuar ve apoptotik yanıtların dahil olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu doktora tez çalışması, pediatrik anestezi pratiğinde İZO toksisitesine karşı, anestezi öncesi verilecek antioksidan özellikli doğal bir ajan desteği ile güvenli anestezi uygulamasını sağlamayı amaçlamıştır. Literatürdeki önceki raporlarımız (Demirgan ve diğ., 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024) ve diğer araştırmacıların çalışmaları (Golomazou ve diğ., 2016; Hassan ve diğ., 2019) çok çeşitli doğal bileşiklerin anesteziye karşı koruyucu etkilerini araştırmıştır, fakat alternatif tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir bitki olan biberiye'nin (*Rosmarinus officinalis*) ana bileşenlerden biri olan rosmarinik asitin (Noor ve diğ., 2022), anestezi ve anestezik maddeler ile ilişkili nörodejenerasyon ve kognitif disfonksiyon üzerine etkisini değerlendiren herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, izoflurana bağlı oluşan nörodejenerasyonda ve kognitif disfonksiyonda, rosmarinik asitin (RA) koruyucu etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Öncelikle RA dozunu belirlemek üzere bir pilot çalışma (Şekil 4.2) gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler sonucunda her anestezi uygulamasından 1 saat önce intranazal yoldan 25 mg/kg olacak şekilde RA rat yavrularına uygulanmıştır.

Rosmarinik asit güçlü antioksidan özelliğine ek olarak antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik, antialerjik, antidepresan, antikanser, yaşlanma karşıtı, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nefroprotektif ve anti-inflamatuar aktiviteler sergilemektedir (Nadeem ve diğ., 2019; Guan ve diğ., 2022). Anestezi-kaynaklı nörodejenerasyon ve kognitif disfonksiyon üzerine etkilerini gösteren bir rapor olmamakla birlikte, nöroprotektif işlevinin çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş olması (Lee ve diğ., 2008; Awad ve diğ., 2009; Ghaffari ve diğ., 2014; Khamse ve diğ., 2015; Hassanzadeh-Taheri ve diğ., 2021), İZO-indüklü toksisite ile ilişkili bilişsel bozukluğa karşı da koruyucu işleve sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu tez kapsamında yapılan MWM testlerinde RA ön terapisinin İZO-kaynaklı öğrenme (Şekil 4.3) ve hafıza (erken, orta ve uzun dönem) bozukluklarını (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) engellediği ortaya konmuştur. HE ve IHC analizleri de her anestezi maruziyetinden önce RA uygulamasının İZO-indüklü apoptoza karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7). Ayrıca, western blot analizleri apoptoz sonuçlarını desteklediği gibi (Şekil 4.8), anesteziye bağlı artan oksidatif ve inflammatuar yanıtların azalmasında da RA ön terapisinin etkinliğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.9). Rosmarinik asitin biyokoruyucu işlevini gösteren artan kanıtlar sonuçlarımızı desteklemektedir. Liang ve diğ. (2020), RA'nın ROS'u azaltarak farelerde oksidatif akciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir. So ve diğ. (2016), makrofaj hücrelerinde LPS ile indüklenmiş inflammatuar yanıtın RA ile zayıflatıldığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde kolit oluşturulmuş farelerde de RA'nın proinflammatuar sitokin seviyelerini azalttığı

raporlanmıştır (Jin ve diğ., 2017). Özellikle rosmarinik asitin nöroprotektif aktivitesi (Ghasemzadeh Rahbardar ve Hosseinzadeh, 2020), bu tez kapsamında elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Lipid peroksidasyonu ve hipokampuste nörodejenerasyonu azaltarak, RA'nın antiepileptik özellik sergilediği *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2008; Ghaffari ve diğ., 2014; Khamse ve diğ., 2015). Özellikle oksidatif stresin azalmasında rol oynayarak Alzheimer hastalığına karşı koruyucu işlev gördüğü de raporlanmıştır (Kantar-Gok ve diğ., 2017). RA tedavisinin oksidatif stresi azaltıp davranışsal bozuklukları düzeltmede rol oynayarak Huntington hastalığına karşı da önemli bir terapötik olabileceği gösterilmiştir (Bhatt ve diğ., 2015). Ayrıca RA uygulamalarının anti-apoptotik özelliği; Parkinson hastalığında dopaminerjik hücre ölümüne karşı önleyici işleviyle (Lee ve diğ., 2008), amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığında motor nöronların kaybını azaltmasıyla (Shimojo ve diğ., 2010) ve iskemi/reperfüzyon hasarında hücre ölümünü azaltmasıyla (Kim ve diğ., 2014) ortaya konulmuştur. Hassanzadeh-Taheri ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda LPS ile indüklenen nöroinflamasyon, oksidatif stres, hipokampal nöral hücre kaybı ve bilişsel bozukluğun RA tedavisi sonucunda azaldığı gösterilmiştir. Bu literatürler ve tez kapsamında elde ettiğimiz moleküler analiz sonuçları İZO-indüklü toksisiteye eşlik eden apoptotik, oksidatif ve inflamatuvar yanıtlara karşı RA'nın koruyucu işlev sergilediğini ortaya koymuştur.

Anksiyete ve benzeri davranışlar, anestezi ve cerrahiye bağlı olarak gözlemlenen kritik sorunlardan biridir (Fortier ve Kain, 2015). Bu davranışlar çoklu genel anesteziye maruz kalan yenidoğan hayvanlarda raporlandığı gibi (Coleman ve ark., 2017; Demirgan ve diğ., 2021; Kargı-Gemici ve diğ., 2024), anestezi alan küçük çocuklarda da bildirilmiştir (Keaney ve diğ., 2004). Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen MWM deneylerinde, hem öğrenme hem de hafıza fazlarında havuz kenarına 10 cm yakınlıktaki bölgede geçirilen zamanın yüzdesi hesaplanarak tigmotaksis (Higaki ve diğ., 2018) değerlendirilmiş ve anesteziye bağlı anksiyete hakkında fikir sahibi olunmuştur. İZO grubundaki ratlarda görülen tigmotaktik davranış profilinin RA ön terapisi alan ratlarda görülmemesi, rosmarinik asitin İZO'nun anksiyeteye ilişkili olumsuz etkisine karşı da önleyici olabileceğini düşündürmektedir.

Ökaryotik hücreler, akut ve kronik stres faktörleriyle başa çıkabilmek için farklı adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Isı şoku cevabı ("Heat shock response" HSR), birçok toksik

etkene karşı hücrenin canlılığının devamını sağlayan esas mekanizmalardan biridir. Evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş bir protein ailesi olan stres/ısı şoku proteinleri (“Heat shock protein”, Hsp) yalnızca hipertermi durumunda değil, çeşitli fiziksel, kimyasal ile mikrobiyal uyaranlara karşı ve farklı hastalık durumlarında karşı ekspresyon seviyeleri artan ve koruyucu işlevleri olan moleküler şaperonlardır (Calabrese ve diğ., 2003). Proteinlerin doğru katlanmasında ve hatalı katlanan proteinlerin eliminasyonunu sağlamada işlev gören bu proteinler, özellikle nörodejenerasyon ve bununla ilişkili hastalıklara karşı koruyucu özellik sergilemektedirler (Trivedi, 2007). Aynı zamanda çeşitli Hsp’lerin embriyojenik nöronal gelişim sürecinde spesifik ekspresyon paternleri gösterdiği bildirilmiştir (Miller ve Fort, 2018). Stres proteinlerinin en bilinen üyelerinden transkripsiyon faktörü HSF1 (“heat shock factor 1”) ve protein homeostazından sorumlu Hsp90, Hsp70 ve Hsp60 ekspresyon seviyelerinin anestezi uygulamalarından nasıl etkilendiğine dair bilgiler oldukça kısıtlıdır; az sayıda çalışmada koruyucu rollerine işaret edilmiştir (McClintick ve diğ., 2011; Vizcaychipi ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen western blot analizleri (Şekil 4.10), İZO’ya bağlı olarak Hsp70 seviyelerinde artış, p-HSF1, Hsp90 ve Hsp60 ekspresyon seviyelerinde ise azalma ortaya koymuştur. RA uygulamasının, İZO kaynaklı artan Hsp70 seviyelerini azalttığı ve azalan Hsp90 ve p-HSF1 seviyelerini ise arttırdığı belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalar Hsp70’in antioksidan ve antiapoptotik özelliğine dikkat çekmiş (Li ve diğ., 2000; Mosser ve diğ., 2000; Clemons ve diğ., 2005), öğrenme ve hafıza fonksiyonu üzerine olumlu etkisi olduğu göstermiştir (Bobkova ve diğ., 2015). Farklı olarak, bu çalışma bulguları İZO maruziyeti sonrası artan Hsp70 seviyelerinin RA ön terapisi ile engellendiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç, İZO anestezisine bağlı olarak artan Hsp70’in HSF1 transkripsiyon faktörünün DNA’ya bağlanmasını engelleyerek (negatif regülasyon) HSF1’in deaktivasyonuna yol açtığını, böylece de HSR’yi zayıflattığını düşündürmektedir (Silveira ve diğ., 2023). Bulgular rosmarinik asitin İZO’ya bağlı Hsp70 seviyelerindeki artışı engelleyip Hsp90 ve p-HSF1 miktarını arttırarak HSR’ye katkı sağladığını (Peffer ve diğ., 2019; Maiti ve diğ., 2023) ve böylece İZO anestezine karşı nöroprotektif etki sergilediğini düşündürmektedir.

Anestezi kaynaklı hasara karşı verdikleri cevap belirsiz olan, fakat beyin gelişimi ve bilişsel süreçlerde önemli işlevleri olan diğer önemli stres protein ailesi üyeleri ise 14-3-3 proteinleridir (Cornell ve Toyo-Oka, 2017) Bu proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi, hem anestezi kaynaklı hasar mekanizması hem de RA’nın

koruyucu olarak işlevinde görev olan hücresel elemanlar hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında yapılan western blot analizleri (Şekil 4.11), İZO grubunda 14-3-3 β , γ , ϵ , ζ ve σ protein ekspresyonlarının önemli seviyelerde azaldığını göstermiştir. Anestezi öncesi RA uygulamalarının ise bu 14-3-3 izoformlarının ekspresyonlarındaki azalmayı önlediği tespit edilmiştir. Nörogenez sürecindeki önemli rollerine ek olarak (Cornell ve Toyo-Oka, 2017), Alzheimer dahil olmak üzere pek çok nöropatolojik süreçte ekspresyonlarında azalma görülmesi, bu proteinlerin protein homeostazında önemli işlevlere sahip olduğuna işaret etmektedir (Abdi ve diğ., 2024).

İlacın vücuda verilış yolu, o ajanın terapötik etkinliğı açısından oldukça önemlidir (Stielow ve diğ., 2023). Kan-beyin bariyerinin (“blood brain barrier” BBB) varlığı terapötik ajanların beyne iletimindeki en büyük sorunlardan biridir (Wu ve diğ., 2023). Rosmarinik asitin biyoyararlanımı ve vücuda iletim yolları üzerine yapılan çalışmalar, bu terapötüğün iletim yolunun oldukça önemli olduğuna dikkat çekmektedir (Nunes ve diğ., 2017; Hitl ve diğ., 2021). *In vivo* bir çalışmaya ait sonuçlar, intraperitoneal uygulama sonrası RA seviyelerinin en fazla böbrek, akciğer, dalak ve karaciğerde olduğunu, beyinde ise oldukça düşük miktarda saptandığını göstermiştir (Chen ve diğ., 2019). Rodentler ile yapılan bir çalışmada, oral yoldan verilen RA’nın <%1 oranında bağırsaklardan emilebildiğı bildirilmiştir (Konishi ve Kobayashi, 2005). Başka bir çalışmada 7 hafta boyunca RA içeren diyet ile beslenen farelerde plazmada rosmarinik aside az miktarda rastlanmasına rağmen, beyinde rastlanamamıştır (Hase ve diğ., 2019). Bu durum, rosmarinik asit gibi polifenollerin beyne geçişinin, beyin kapiller endotelial hücreleri tarafından oluşturulan BBB tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesinden ve bu eksojen maddelerin bu bariyeri geçişine izin verilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, RA yüklü lipid nanopartiküllerin intranazal yoldan uygulandığında kan beyin bariyerini geçtiğı daha önce gösterilmiştir (Bhatt ve diğ., 2015). Bu durum, rosmarinik asidin nanopartiküllere yüklenmesi ile ilişkili olabileceğı gibi intranazal uygulamanın bizzat kendisi ile ilgili avantajından da kaynaklanmış olabilir. Nazal kaviteye uygulanan ilaçların beyne ulaşması için iki farklı yolak vardır. Birincisi ve aslında en önemli yolak nöronal yolak iken, daha az etkili olan minör yolak sistemik dolaşım ile gerçekleşen yolaktır. Özellikle nazal kavitede bulunan olfaktör sinirin beyne giriş bölümünde BBB bulunmamaktadır. Bu bölge BBB’yi geçemeyen ilaçların etki yerine ulaşabilmesi için iyi bir alternatiftir (Agrawal ve diğ., 2018). Bu sebeple, bu tez kapsamında rosmarinik asitin beyne iletimini sağlamak amacıyla intranazal yoldan uygulanması tercih edildi ve sonuçların

terapötik verimliliği ile potansiyel koruyucu bir ürün gelişimine katkı sağlanması hedeflendi. Bu kapsamda, yapılan tez çalışmasının en önemli limitasyonu intranasal yoldan uygulanan RA'nın beyine geçen miktarının/konsantrasyonunun ölçülmemesidir. Bu konu ile ilgili olarak gelecekte yapmayı planladığımız deneyler ile (HPLC analizi gibi) bu limitasyonu kaldırmayı amaçlıyoruz.

Tez kapsamında ulaştığımız sonuçları genel olarak ele aldığımızda, İZO maruziyetinden bir saat önce intranasal yolla RA uygulamasının, gelişmekte olan sıçan beyninin hipokampal nöronlarını apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruduğu ve mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarını azalttığı ortaya çıkmaktadır. Bu tez projesi, anesteziye önce rosmarinik asitin burun deliğinden uygulanmasının, ajanın kan beyin bariyeri engeline takılmadan beyine kolay ulaşımını sağlayabileceğini ve bu yolla da gelişmekte olan beyindeki postoperatif bilişsel eksiklik riskini önlemek için etkili bir strateji olabileceğini ileri sürmektedir. Bulgularımız, RA uygulamasının pediatrik pratikte genel anestezi uygulamalarının yan etkileri için yeni bir terapötik yaklaşım sağlayabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abdi, G., Jain, M., Patil, N., Upadhyay, B., Vyas, N., Dwivedi, M., and Kaushal, R.S., 2024, 14-3-3 proteins-a moonlight protein complex with therapeutic potential in neurological disorder: in-depth review with Alzheimer's disease, *Frontiers in molecular biosciences*, 11, 1286536.
- Abisambra, J.F., Blair, L.J., Hill, S.E., Jones, J.R., Kraft, C., Rogers, J., Koren, J., 3rd, Jinwal, U. K., Lawson, L., Johnson, A.G., Wilcock, D., O'Leary, J.C., Jansen-West, K., Muschol, M., Golde, T.E., Weeber, E.J., Banko, J., and Dickey, C.A., 2010, Phosphorylation dynamics regulate Hsp27-mediated rescue of neuronal plasticity deficits in tau transgenic mice, *The Journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience*, 30 (46), 15374-15382.
- Adomako-Bonsu, A.G., Chan, S.L., Pratten, M., and Fry, J.R., 2017, Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics, *Toxicology in vitro*, 40, 248-255.
- Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Antimisari, S.G., Chougule, M.B., Shoyele, S.A., and Alexander, A., 2018, Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs, *Journal of controlled release*, 281, 139-177.
- Airoldi, C., Sironi, E., Dias, C., Marcelo, F., Martins, A., Rauter, A.P., Nicotra, F., and Jimenez-Barbero, J., 2013, Natural compounds against Alzheimer's disease: molecular recognition of A β 1-42 peptide by *Salvia sclareoides* extract and its major component, rosmarinic acid, as investigated by NMR, *Chemistry, an asian journal*, 8 (3), 596-602.
- Aitken A., 2006, 14-3-3 proteins: a historic overview, *Seminars in cancer biology*, 16 (3), 162-172.
- Albin, M., and Nikodemski, T., 2018, Always check anaesthetic equipment, *Anaesthesiology intensive therapy*, 50 (1), 85--86.
- Angelov, S., and Iohom, G., 2023, Maintenance of anaesthesia, *Anaesthesia & intensive care medicine*, 24 (2), 85-88.
- Apai, C., Shah, R., Tran, K., and Pandya Shah, S., 2021, Anesthesia and the Developing Brain: A Review of Sevoflurane-induced Neurotoxicity in Pediatric Populations, *Clinical therapeutics*, 43 (4), 762-778.
- Archer, W.H., and Wells, H., 1960, The history of general anesthesia: Published in the Hartford (Conn.) Courant, Dec. 9, 1846, *Journal of the american dental society of anesthesiology*, 7 (2), 12.
- Arispe, N., Doh, M., and De Maio, A., 2002, Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70, *Cell stress & chaperones*, 7 (4), 330--338.
- Arnold, J.H., Truog, R.D., and Rice, S.A., 1993, Prolonged administration of isoflurane to pediatric patients during mechanical ventilation, *Anesthesia and analgesia*, 76 (3), 520-526.

- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V.L., and Arnason, J.T., 2009, Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity, *Phytotherapy research: PTR*, 23 (8), 1075-1081.
- Belrose, J.C., and Noppens, R.R., 2019, Anesthesiology and cognitive impairment: a narrative review of current clinical literature, *BMC anesthesiology*, 19 (1), 241.
- Bhatt, R., Singh, D., Prakash, A., and Mishra, N., 2015, Development, characterization and nasal delivery of rosmarinic acid-loaded solid lipid nanoparticles for the effective management of Huntington's disease, *Drug delivery*, 22 (7), 931-939.
- Bobkova, N.V., Evgen'ev, M., Garbuz, D.G., Kulikov, A.M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., and Nudler, E., 2015, Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 112 (52), 16006-16011.
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., and Towiwat, P., 2014, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl., *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 124, 67-73.
- Bradley, A.E., Bolon, B., Butt, M.T., Cramer, S.D., Czasch, S., Garman, R.H., George, C., Gröters, S., Kaufmann, W., Kovi, R.C., Krinke, G., Little, P.B., Narama, I., Rao, D.B., Sharma, A.K., Shibutani, M., and Sills, R., 2020, Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Central and Peripheral Nervous Systems: New and Revised INHAND Terms, *Toxicologic pathology*, 48, 827-844.
- Brunson, D.B., 2008, *Pharmacology of inhalation anesthetics*. In: Fish, R. E., Brown, M.J., Danneman, P.J., Karas, A.Z. (eds.) *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*, 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. p. 83-95
- Butterworth, IV, J.F., Mackey, D.C., and Wasnick, J.D., 2013, *Morgan & Mikhail's. Clinical Anesthesiology*, McGraw Hill Medical Books, ISBN:9781264842087.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Colombrita, C., Ravagna, A., Pennisi, G., Giuffrida Stella, A.M., Galli, F., and Butterfield, D.A., 2003, Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach, *Amino acids*, 25 (3-4), 437-444.
- Cappello, F., Marino Gammazza, A., Palumbo Piccionello, A., Campanella, C., Pace, A., Conway de Macario, E., and Macario, A.J., 2014, Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents, *Expert opinion on therapeutic targets*, 18 (2), 185-208.
- Cascella, M., Bimonte, S., and Di Napoli, R., 2020, Delayed Emergence from Anesthesia: What We Know and How We Act, *Local and regional anesthesia*, 13, 195-206.
- Ce, P., Erkizan, O., and Gedizlioglu, M., 2011, Elevated HSP27 levels during attacks in patients with multiple sclerosis, *Acta neurologica scandinavica*, 124 (5), 317-320.
- Chen, B.Z., Chu, Q.J., Yu, J.R., Yao, Y.S., Tan, L., 2015, The effect of remifentanyl on the minimum alveolar concentration of isoflurane in children, *Journal of clinical anesthesia*, 27 (6), 504-507.
- Chen, J., Bao, X., Lin, C., and Zhou, G., 2019, Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats and tissue distribution in mice, *Latin american journal of pharmacy*, 38 (5), 985-90.

- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., and Malanda, B., 2018, IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281.
- Christensen, J.H., Nielsen, M.N., Hansen, J., Füchtbauer, A., Füchtbauer, E.M., West, M., Corydon, T.J., Gregersen, N., and Bross, P., 2010, Inactivation of the hereditary spastic paraplegia-associated Hspd1 gene encoding the Hsp60 chaperone results in early embryonic lethality in mice, *Cell stress & chaperones*, 15 (6), 851-863.
- Clemons, N.J., Buzzard, K., Steel, R., and Anderson, R.L., 2005, Hsp72 inhibits Fas-mediated apoptosis upstream of the mitochondria in type II cells, *The Journal of biological chemistry*, 280 (10), 9005-9012.
- Coleman, K., Robertson, N.D., Dissen, G.A., Neuringer, M.D., Martin, L.D., Cuzon Carlson, V.C., Kroenke, C., Fair, D., Brambrink, A.M., 2017, Isoflurane Anesthesia Has Long-term Consequences on Motor and Behavioral Development in Infant Rhesus Macaques, *Anesthesiology*, 126 (1), 74-84.
- Colucci, M., Roccatagliata, L., Capello, E., Narciso, E., Latronico, N., Tabaton, M., and Mancardi, G.L., 2004, The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker of disease severity, *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 10 (5), 477-481.
- Cooter, M., Ni, K., Thomas, J., Gupta, D.K., Hopkins, T.J., Miller, T.E., James, M.L., Kertai, M.D., Berger, M., 2020, Age-dependent decrease in minimum alveolar concentration of inhaled anaesthetics: a systematic search of published studies and meta-regression analysis, *British journal of anaesthesia*, 124 (1), e4-e7.
- Cornell, B., and Toyo-Oka, K., 2017, 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis, *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 318.
- Cornell, B., Wachi, T., Zhukarev, V., and Toyo-Oka, K., 2016, Overexpression of the 14-3-3gamma protein in embryonic mice results in neuronal migration delay in the developing cerebral cortex, *Neuroscience letters*, 628, 40-46.
- Creeley, C.E., Dikranian, K.T., Dissen, G.A., Back, S.A., Olney, J.W., and Brambrink, A.M., 2014, Isoflurane-induced apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the fetal rhesus macaque brain, *Anesthesiology*, 120 (3), 626-638.
- Das, S., and Basu, A., 2008, Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis, *Journal of neuroscience research*, 86 (6), 1199-1208.
- Dashti-Khavidaki, S., Moghaddas, A., Heydari, B., Khalili, H., Lessan-Pezeshki, M., and Lessan-Pezeshki, M., 2013, Statins against drug-induced nephrotoxicity, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the canadian society for pharmaceutical sciences, societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 16 (4), 588-608.
- DeCarli, C., 2003, Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment, *The Lancet - Neurology*, 2 (1), 15-21.
- Demirgan, S., Akyol, O., Temel, Z., Şengelen, A., Pekmez, M., Demirgan, R., Sevdi, M.S., Erkalp, K., and Selcan, A., 2019, Isoflurane exposure in infant rats acutely increases aquaporin 4 and does not cause neurocognitive impairment, *Bosnian journal of basic medical sciences*, 19 (3), 257-264.

- Demirgan, S., Akyol, O., Temel, Z., Şengelen, A., Pekmez, M., Ulaş, O., Sevdı, M.S., Erkalp, K., and Selcan, A., 2021, Intranasal levosimendan prevents cognitive dysfunction and apoptotic response induced by repeated isoflurane exposure in newborn rats, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 394 (7), 1553-1567.
- Diao, S., Ni, J., Shi, X., Liu, P., and Xia, W., 2014, Mechanisms of action of general anesthetics, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19 (5), 747-757.
- Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B., Patterson, C., Dickson, D.W., Nahman, N.S., Jr, Hutton, M., Burrows, F., and Petrucelli, L., 2007, The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins, *The Journal of clinical investigation*, 117 (3), 648-658.
- DiMaggio, C., Sun, L.S., and Li, G., 2011, Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort, *Anesthesia and analgesia*, 113 (5), 1143-1151.
- Disma, N., Mondardini, M.C., Terrando, N., Absalom, A.R., Bilotta, F., 2016, A systematic review of methodology applied during preclinical anesthetic neurotoxicity studies: important issues and lessons relevant to the design of future clinical research, *Paediatric anaesthesia*, 26 (1), 6-36.
- Dodds, C., 1999, General anaesthesia: practical recommendations and recent advances, *Drugs*, 58 (3), 453-467.
- Domitrović, R., Potočnjak, I., Crnčević-Orlić, Z., and Škoda, M., 2014, Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice, *Food and chemical toxicology: an international journal published for the british industrial biological research association*, 66, 321-328.
- Domitrović, R., Škoda, M., Vasiljev Marchesi, V., Cvijanović, O., Pernjak Pugel, E., and Stefan, M. B., 2013, Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice, *Food and chemical toxicology: an international journal published for the british industrial biological research association*, 51, 370-378.
- Eckenhoff, R.G., and Johansson, J.S., 1997, Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins, *Pharmacological reviews*, 49 (4), 343-367.
- Elufioye, T. O., and Habtemariam, S., 2019, Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 112, 108600.
- Eshetie, D., Getinet, H., Abdissa, Z., and Mollalign, M., 2020, Incidence and associated factors of emergence agitation after general anesthesia and surgery among pediatric patients: a prospective follow-up study, *International journal of surgery Open*, 27, 25-31.
- Evans, C.G., Wisén, S., and Gestwicki, J.E., 2006, Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro, *The Journal of biological chemistry*, 281 (44), 33182-33191.
- Fachel, F.N.S., Michels, L.R., Azambuja, J.H., Lenz, G.S., Gelsleichter, N.E., Endres, M., Scholl, J.N., Schuh, R.S., Barschak, A.G., Figueiró, F., Bassani, V.L., Henriques, A.T., Koester, L.S., Teixeira, H.F., and Braganhol, E., 2020, Chitosan-coated rosmarinic acid nanoemulsion nasal administration protects against LPS-induced memory deficit,

- neuroinflammation, and oxidative stress in Wistar rats. *Neurochemistry international*, 141, 104875.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A., 2007, GPower 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences, *Behavior research methods*, 39 (2), 175-191.
- FDA, 2017, FDA Drug Safety Communication: FDA review results in new warnings about using general anesthetics and sedation drugs in young children and pregnant women, http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm532356.htm?source=govdelivery&utm_medium=email&utm_source=govdelivery (Accessed 02/01/2025).
- Feng, Y.P., Yang, T.S., Chung, C.H., Chien, W.C., Wong, C.S., 2020, Early childhood general anesthesia exposure associated with later developmental delay: A national population-based cohort study, *Plos one*, 15 (9), e0238289.
- Flick, R.P., Katusic, S.K., Colligan, R.C., Wilder, R.T., Voigt, R.G., Olson, M.D., Sprung, J., Weaver, A.L., Schroeder, D.R., Warner, D.O., 2011, Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery, *Pediatrics*, 128 (5), e1053-1061.
- Fonteles, A.A., de Souza, C.M., de Sousa Neves, J.C., Menezes, A.P., Santos do Carmo, M.R., Fernandes, F.D., de Araújo, P.R., and de Andrade, G.M., 2016, Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice, *Behavioural brain research*, 297, 91-103.
- Fortier, M.A., Kain, Z.N., 2015, Treating perioperative anxiety and pain in children: a tailored and innovative approach, *Paediatric anaesthesia*, 25 (1), 27-35.
- Franklin, T.B., Krueger-Naug, A.M., Clarke, D.B., Arrigo, A.P., and Currie, R.W., 2005, The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system, *International journal of hyperthermia : the official journal of european society for hyperthermic oncology, north american hyperthermia group*, 21 (5), 379-392.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R., 1984, Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors?, *Nature*, 310 (5978), 599-601.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R., 1987, What is the molecular nature of general anaesthetic target sites?, *Trends in Pharmacological sciences*, 8 (5), 169-174.
- Frost, E.A., 2014, A review of mechanisms of inhalational anesthetic agents, *Essentials of pharmacology for anesthesia, pain medicine, and critical care*, 49-60.
- Fu, H., Subramanian, R.R., and Masters, S.C., 2000, 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 617-647.
- Fujii, K., Tanabe, Y., Kobayashi, K., Uchikawa, H., and Kohno, Y., 2005, Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid in mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, *Journal of the neurological sciences*, 239 (1), 115-118.
- Gaba, D.M., 2000, Anaesthesiology as a model for patient safety in health care, *BMJ (Clinical research ed.)*, 320 (7237), 785-788.
- Gardino, A.K., and Yaffe, M.B., 2011, 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis, *Seminars in cell & developmental biology*, 22 (7), 688-695.
- Garman, R.H., 2011, Histology of the Central Nervous System, *Toxicologic pathology*, 39, 22-35.

- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G., 2006, Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumourigenic properties, *Cell Cycle*, 5 (22), 2592-2601.
- Ghaffari, H., Venkataramana, M., Jalali Ghassam, B., Chandra Nayaka, S., Nataraju, A., Geetha, N.P., and Prakash, H.S., 2014, Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells, *Life sciences*, 113 (1-2), 7-13.
- Ghasemzadeh Rahbardar, M., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S.J., and Hosseinzadeh, H., 2017, Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 86, 441-449.
- Ghasemzadeh Rahbardar, M., and Hosseinzadeh, H., 2020, Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393 (10), 1779-1795.
- Golomazou, E., Malandrakis, E.E., Kavouras, M., Karatzinos, T., Miliou, H., Exadactylos, A., and Panagiotaki, P., 2016, Anaesthetic and genotoxic effect of medicinal plant extracts in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture*, 464, 673-682.
- Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., and Wada, K., 2009, Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, *Neurochemistry international*, 54 (5-6), 330-338.
- Govindaraj, J., and Sorimuthu Pillai, S., 2015, Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats, *Molecular and cellular biochemistry*, 404 (1-2), 143-159.
- Grabowski, J., Goldin, A., Arthur, L.G., Beres, A.L., Guner, Y.S., Hu, Y.Y., Kawaguchi, A. L., Kelley-Quon, L.I., McAteer, J.P., Miniati, D., Renaud, E.J., Ricca, R., Slidell, M.B., Smith, C.A., Sola, J.E., Sømme, S., Downard, C. D., Gosain, A., Valusek, P., St Peter, S.D., Jagannathan N.S., Dasgupta, R., 2021, The effects of early anesthesia on neurodevelopment: A systematic review, *Journal of pediatric surgery*, 56 (5), 851-861.
- Guan, H., Luo, W., Bao, B., Cao, Y., Cheng, F., Yu, S., Fan, Q., Zhang, L., Wu, Q., and Shan, M., 2022, A Comprehensive Review of Rosmarinic Acid: From Phytochemistry to Pharmacology and Its New Insight, *Molecules*, 27 (10), 3292.
- Gulyás, M., Bencsik, N., Pusztai, S., Liliom, H., and Schlett, K., 2016, AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program, *Neuroinformatics*, 14 (4), 479-481.
- Hagberg, H., Gressens, P., and Mallard, C., 2012, Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults, *Annals of neurology*, 71 (4), 444-457.
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., and Yamada, M., 2009, Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway, *The American journal of pathology*, 175 (6), 2557-2565.

- Han, D., Jin, J., Fang, H., and Xu, G., 2015, Long-term action of propofol on cognitive function and hippocampal neuroapoptosis in neonatal rats, *International journal of clinical and experimental medicine*, 8 (7), 10696-10704.
- Hanson, J.L., Nacewicz, B.M., Sutterer, M.J., Cayo, A.A., Schaefer, S.M., Rudolph, K.D., Shirtcliff, E.A., Pollak, S.D., and Davidson, R.J., 2015, Behavioral problems after early life stress: contributions of the hippocampus and amygdala, *Biological psychiatry*, 77 (4), 314-323.
- Harless, E., and von Bibra, E., 1847, *Die Ergebnisse der Versuche über die Wirkung des Schwefeläthers*, Erlangen: Verlag von Carl Heyder.
- Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yamada, M., and Kobayashi, S., 2019, Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion, *Scientific reports*, 9 (1), 8711. 1
- Hassan, A.M.S., Abo El-Ela, F.I., and Abdel-Aziz, A.M., 2019, Investigating the potential protective effects of natural product quercetin against imidacloprid-induced biochemical toxicity and DNA damage in adult rats, *Toxicology reports*, 6, 727-735.
- Hassanzadeh-Taheri, M., Ahmadi-Zohan, A., Mohammadifard, M., and Hosseini, M., 2021, Rosmarinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in rats, *Journal of chemical neuroanatomy*, 117, 102008.
- Hawkey, T.F., Preston, M. and Maani, C.V., 2020, *Isoflurane*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Higaki, A., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.J., Bai, H.Y., Shan, B.S., Kan-No, H., Ikeda, S., Higaki, J., and Horiuchi, M., 2018, Recognition of early stage thigmotaxis in Morris water maze test with convolutional neural network, *PloS one*, 13 (5), e0197003.
- Hitl, M., Kladar, N., Gavarić, N., and Božin, B., 2021, Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits, *Planta medica*, 87 (4), 273-282.
- Hu, Z.N., Huang, L.J., and Chen, W.P., 2018, The inhibitory effects of rosmarinic acid on catabolism induced by IL-1 β in rat chondrocytes, *Acta biochimica Polonica*, 65 (4), 535-538.
- Hughes, J., Leach, H.J., and Choonara, I., 1993, Hallucinations on withdrawal of isoflurane used as sedation, *Acta paediatrica*, 82 (10), 885-886.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., and Takahashi, Y., 1988, Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (19), 7084-7088.
- Istaphanous, G.K., Howard, J., Nan, X., Hughes, E.A., McCann, J.C., McAuliffe, J.J., Danzer, S.C., and Loepke, A.W., 2011, Comparison of the neuroapoptotic properties of equipotent anesthetic concentrations of desflurane, isoflurane, or sevoflurane in neonatal mice, *Anesthesiology*, 114 (3), 578-587.
- Istaphanous, G.K., Ward, C.G., Nan, X., Hughes, E.A., McCann, J.C., McAuliffe, J.J., Danzer, S.C., and Loepke, A.W., 2013, Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex, *Anesthesia and analgesia*, 116 (4), 845-854.

- Ito, N., Yabe, T., Gamo, Y., Nagai, T., Oikawa, T., Yamada, H., and Hanawa, T., 2008, Rosmarinic acid from *Perillae Herba* produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31(7), 1376-1380.
- Jiang, Y.Q., Wang, X.L., Cao, X.H., Ye, Z.Y., Li, L., and Cai, W.Q., 2013, Increased heat shock transcription factor 1 in the cerebellum reverses the deficiency of Purkinje cells in Alzheimer's disease, *Brain research*, 1519, 105-111.
- Jin, B.R., Chung, K.S., Cheon, S.Y., Lee, M., Hwang, S., Noh Hwang, S., Rhee, K.J., and An, H.J., 2017, Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation, *Scientific reports*, 7, 46252.
- Jin, Q., Liu, T., Qiao, Y., Liu, D., Yang, L., Mao, H., Ma, F., Wang, Y., Peng, L., and Zhan, Y., 2023, Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols, *Frontiers in immunology*, 14, 1185317.
- Jin, X., Liu, P., Yang, F., Zhang, Y.H., and Miao, D., 2013, Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and Up-regulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes, *Neurochemical research*, 38 (9), 1828-1837.
- Johnson, S.A., Young, C., Olney, J.W., 2008, Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice, *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 20 (1), 21-28.
- Jones, M.V., Brooks, P.A., and Harrison, N.L., 1992, Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl⁻ currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics, *The Journal of physiology*, 449, 279-293.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A., 2010, The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11 (8), 579-592.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E., 2009, Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins, *Cell stress and chaperones*, 14 (1), 105-111.
- Kantar-Gok, D., Hidisoglu, E., Er, H., Acun, A.D., Olgar, Y., and Yargıoğlu, P., 2017, Changes of auditory event-related potentials in ovariectomized rats injected with d-galactose: Protective role of rosmarinic acid, *Neurotoxicology*, 62, 64-74.
- Kargı-Gemici, E., Şengelen, A., Aksüt, Y., Akyol, O., Şengiz-Erhan, S., Bay, M., Önay-Uçar, E., Selcan, A., and Demirkan, S., 2024, Cerium oxide nanoparticles (nanoceria) pretreatment attenuates cell death in the hippocampus and cognitive dysfunction due to repeated isoflurane anesthesia in newborn rats, *Neurotoxicology*, 105, 82-93.
- Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., and Budka, H., 2004, 14-3-3 proteins in Lewy body-like hyaline inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Acta neuropathologica*, 108 (6), 531-537.
- Kayhan, Z., 2019, *Klinik Anestezi*, 4. Baskı, Logos Yayıncılık, Ankara.
- Keaney, A., Diviney, D., Harte, S., Lyons, B., 2004, Postoperative behavioral changes following anesthesia with sevoflurane, *Paediatric anaesthesia*, 14 (10), 866-870.

- Kelsall, A.W., Ross-Russell, R., and Herrick, M.J., 1994, Reversible neurologic dysfunction following isoflurane sedation in pediatric intensive care, *Critical care medicine*, 22 (6), 1032-1034.
- Keys, T.E., 1975, Historical vignettes: Dr. Arthur Ernest Guedel 1883-1956, *Anesthesia and analgesia*, 54 (4), 442-443.
- Khamse, S., Sadr, S.S., Roghani, M., Hasanzadeh, G. and Mohammadian, M., 2015, Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms, *Pharmaceutical biology*, 53 (12), 1818-1825,
- Kim, D.S., Kim, H.R., Woo, E.R., Hong, S.T., Chae, H.J. and Chae, S.W., 2005, Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase, *Biochemical pharmacology*, 70 (7), 1066-1078.
- Kim, H., Han, J.R., Park, J., Oh, M., James, S.E., Chang, S., Lu, Q., Lee, K.Y., Ki, H., Song, W. J., and Kim, K., 2008, Delta-catenin-induced dendritic morphogenesis. An essential role of p190RhoGEF interaction through Akt1-mediated phosphorylation, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2), 977-987.
- Kim, J.Y., Barua, S., Huang, M.Y., Park, J., Yenari, M.A., and Lee, J.E., 2020, Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury, *Cells*, 9 (9), 2020.
- Kim, M., Shin, M.S., Lee, J.M., Cho, H.S., Kim, C.J., Kim, Y.J., Choi, H.R., and Jeon, J.W., 2014, Inhibitory effects of isoquinoline alkaloid berberine on ischemia-induced apoptosis via activation of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, *International neurology journal*, 18 (3), 115-125.
- Kodama, M., Satoh, Y., Otsubo, Y., Araki, Y., Yonamine, R., Masui, K., and Kazama, T., 2011, Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory, *Anesthesiology*, 115 (5), 979-991.
- Konishi, Y., and Kobayashi, S., 2005, Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69 (3), 583-591.
- Kopp Lugli, A., Yost, C.S. and Kindler, C.H., 2009, Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia, *European journal of anaesthesiology*, 26 (10), 807-820.
- Koren, J., 3rd, Jinwal, U.K., Lee, D.C., Jones, J.R., Shults, C.L., Johnson, A.G., Anderson, L.J., and Dickey, C.A., 2009, Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease, *Journal of cellular and molecular medicine*, 13 (4), 619-630.
- Labrador-Garrido, A.W.C., and Roodveldt, C., 2011, *The Hsp70 Chaperone System in Parkinson's Disease*, Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease, In: Rana A.Q. (ed.), Chapter 10, InTech. 221-246.
- Lau, J.M., Wu, C., and Muslin, A.J., 2006, Differential role of 14-3-3 family members in *Xenopus* development, *Developmental dynamics : an official publication of the american association of anatomists*, 235 (7), 1761-1776.
- Lee, H.J., Cho, H.S., Park, E., Kim, S., Lee, S.Y., Kim, C.S., Kim, D.K., Kim, S.J., and Chun, H.S., 2008, Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis, *Toxicology*, 250 (2-3), 109-115.

- Lee, Y.M., Song, B.C. and Yeum, K.J., 2015, Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation, *Biomed research international*, 242709.
- Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I., and Seo, J.S., 2000, Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation, *The Journal of biological chemistry*, 275 (33), 25665-25671.
- Li, F.Q., Mofunanya, A., Harris, K., and Takemaru, K., 2008, Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity, *The Journal of cell biology*, 181 (7), 1141-1154.
- Li, G.S., Jiang, W.L., Tian, J.W., Qu, G.W., Zhu, H.B., and Fu, F.H., 2010, In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis, *Phytomedicine: International journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 17 (3-4), 282-288.
- Li, M., Cui, Z., Niu, Y., Liu, B., Fan, W., Yu, D., and Deng, J., 2010, Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex, *Brain research bulletin*, 81 (1), 107-113.
- Li, Q., Zhou, D.N., Tu, Y.Q., Wu, X.W., Pei, D.Q., and Xiong, Y., 2022, Ketamine administration ameliorates anesthesia and surgery-induced cognitive dysfunction via activation of TRPV4 channel opening, *Experimental and therapeutic medicine*, 24 (1), 478.
- Li, X.L., Liu, J.X., Li, P., and Zheng, Y.Q., 2014, Protective effect of rosmarinic acid on hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = China journal of chinese materia medica*, 39 (10), 1897-1901.
- Li, Y., Liang, G., Wang, S., Meng, Q., Wang, Q., and Wei, H., 2007, Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats, *Neuropharmacology*, 53 (8), 942-950.
- Liang, G., Ward, C., Peng, J., Zhao, Y., Huang, B., and Wei, H., 2010, Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice, *Anesthesiology*, 112 (6), 1325-1334.
- Liang, T., Hu, X., Zeng, L., Zhou, Z., Zhang, J., Xu, Z., Zeng, J., and Xu, P., 2024, HSP90 β regulates EAAT2 expression and participates in ischemia-reperfusion injury in rats, *Molecular medicine reports*, 29 (1), 5.
- Liang, Z., Wu, L., Deng, X., Liang, Q., Xu, Y., Deng, R., Lv, L., Ji, M., Hao, Z., and He, J., 2020, The antioxidant rosmarinic acid ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma via modulation of NADPH oxidases and antioxidant enzymes, *Inflammation*, 43 (5), 1902-1912.
- Lianos, G.D., Alexiou, G.A., Mangano, A., Mangano, A., Rausei, S., Boni, L., Dionigi, G., Roukos, D.H., 2015, The role of heat shock proteins in cancer, *Cancer letters*, 360 (2), 114-118.
- Lin, C., Xiao, J., Xi, Y., Zhang, X., Zhong, Q., Zheng, H., Cao, Y., and Chen, Y., 2019, Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans*, *BioFactors*, 45(5), 774-787.
- Liu, W., Xu, J., Wang, H., Xu, C., Ji, C., Wang, Y., Feng, C., Zhang, X., Xu, Z., Wu, A., Xie, Z., and Yue, Y., 2012, Isoflurane-induced spatial memory impairment by a mechanism independent of amyloid-beta levels and tau protein phosphorylation changes in aged rats, *Neurological research*, 34 (1), 3-10.

- Liu, X., Ji, J., and Zhao, G.Q., 2020, General anesthesia affecting the developing brain: evidence from animal to clinical research, *Journal of anesthesia*, 34 (5), 765-772.
- Liu, Y., Xu, X., Tang, H., Pan, Y., Hu, B. and Huang, G., 2021, Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells, *International journal of molecular medicine*, 47 (5), 67.
- Loepke, A.W., Istaphanous, G., Albers, E., McCann, J.C., Vorhees, C., and Danzer, S.C., 2007 Neonatal isoflurane anesthesia does not impair neurocognitive function and behavior in the same mice in adulthood, *Society of pediatric anesthesia winter meeting*, Phoenix, 1-4.
- Lu, C., Zou, Y., Liu, Y., and Niu, Y., 2017, Rosmarinic acid counteracts activation of hepatic stellate cells via inhibiting the ROS-dependent MMP-2 activity: Involvement of the Nrf2 antioxidant system, *Toxicology and applied pharmacology*, 318, 69-78,
- Luan, H., Kan, Z., Xu, Y., Lv, C. and Jiang, W., 2013, Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: Relation to inflammation response, *Journal of neuroinflammation*, 10, 28.
- Lucarini, R., Bernardes, W.A., Ferreira, D.S., Tozatti, M.G., Furtado, R., Bastos, J.K., Pauletti, P.M., Januário, A.H., Silva, M.L., and Cunha, W.R., 2013, In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid, and its acetyl ester derivative, *Pharmaceutical biology*, 51 (9), 1087-1090.
- Lyon, M.S., and Milligan, C., 2019, Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: New perspectives, *Neuroscience letters*, 711, 134462.
- Ma, Z., Yang, J., Yang, Y., Wang, X., Chen, G., Shi, A., Lu, Y., Jia, S., Kang, X., and Lu, L., 2020, Rosmarinic acid exerts an anticancer effect on osteosarcoma cells by inhibiting DJ-1 via regulation of the PTEN-PI3K-Akt signaling pathway, *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 68, 153186.
- Mackintosh C., 2004, Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes, *The Biochemical journal*, 381 (Pt 2), 329-342.
- Magrané, J., Smith, R.C., Walsh, K., and Querfurth, H.W., 2004, Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons, *The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 24 (7), 1700-1706.
- Maiti, S., Bhattacharya, K., Wider, D., Hany, D., Panasencko, O., Bernasconi, L., Hulo, N., and Picard, D., 2023, Hsf1 and the molecular chaperone Hsp90 support a 'rewiring stress response' leading to an adaptive cell size increase in chronic stress, *eLife*, 12, RP88658.
- Malik, N.A., 2021, *Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*, Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Singapore.
- Maloney, S.E., Yuede, C.M., Creeley, C.E., Williams, S.L., Huffman, J.N., Taylor, G.T., Noguchi, K.N., Wozniak, D.F., 2019, Repeated neonatal isoflurane exposures in the mouse induce apoptotic degenerative changes in the brain and relatively mild long-term behavioral deficits, *Scientific reports*, 9 (1), 2779.
- McBeth, C., and Watkins, T.G., 1996, Isoflurane for sedation in a case of congenital myasthenia gravis, *British journal of anaesthesia*, 77 (5), 672-674.

- McCann, M. E., de Graaff, J. C., Dorris, L., Disma, N., Withington, D., Bell, G., Grobler, A., Stargatt, R., Hunt, R. W., Sheppard, S. J., Marmor, J., Giribaldi, G., Bellinger, D. C., Hartmann, P. L., Hardy, P., Frawley, G., Izzo, F., von Ungern Sternberg, B. S., Lynn, A., Wilton, N., Berde, C., Soriano, S., Davidson, A.J., GAS Consortium, 2019, Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): An international, multicentre, randomised, controlled equivalence trial, *Lancet*, 393 (10172), 664-677.,
- McClintick, C.A., Theisen, C.S., Ferns, J.E., Fibuch, E.E., and Seidler, N.W., 2011, Isoflurane preconditioning involves upregulation of molecular chaperone genes, *Biochemical and biophysical research communications*, 411 (2), 387-392,
- McLean, P.J., Klucken, J., Shin, Y., and Hyman, B.T., 2004, Geldanamycin induces Hsp70 and prevents alpha-synuclein aggregation and toxicity in vitro, *Biochemical and biophysical research communications*, 321 (3), 665-669.
- Miao, L., Teng, J., Lin, J., Liao, X., and Chen, J., 2013, 14-3-3 proteins interact with neurofilament protein-L and regulate dynamic assembly of neurofilaments, *Journal of cell science*, 126 (Pt 2), 427-436.
- Miller, D.J., and Fort, P.E., 2018, Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment, *Frontiers in neuroscience*, 12, 821.
- Miller, K.W., Paton, W.D., Smith, R.A., and Smith, E.B., 1973, The pressure reversal of general anesthesia and the critical volume hypothesis, *Molecular pharmacology*, 9 (2), 131-143.
- Modell, J.H., 2005, Assessing the past and shaping the future of anesthesiology: The 43rd Rovenstine Lecture, *Anesthesiology*, 102 (5), 1050-1057,
- Moore, B.W., and Perez, V.J., 1967, *Specific acidic proteins of the nervous system*, In: Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integratin, In: Carlson F.D. (ed.), New Jersey, NJ: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 343-359.
- Morales, D., Skoulakis, E.C., and Acevedo, S.F., 2012, 14-3-3s are potential biomarkers for HIV-related neurodegeneration, *Journal of neurovirology*, 18 (5), 341-353.
- Morris, R., 1984, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *Journal of neuroscience methods*, 11 (1), 47-60.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I., and Massie, B., 2000, The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis, *Molecular and cellular biology*, 20 (19), 7146-7159.
- Murman D.L., 2015, The Impact of Age on Cognition, *Seminars in hearing*, 36 (3), 111-121.
- Murphy, K.L. and Baxter, M.G., 2013, Long-term effects of neonatal single or multiple isoflurane exposures on spatial memory in rats, *Frontiers in neurology*, 4, 87.
- Murphy, K.L., Baxter, M.G., and Flecknell, P.A., 2012, Chapter 17 - Anesthesia and analgesia in nonhuman primates, *Nonhuman primates in biomedical research*, 403-435.
- Mushtaq, N., Schmatz, R., Ahmed, M., Pereira, L.B., da Costa, P., Reichert, K.P., Dalenogare, D., Pelinson, L.P., Vieira, J.M., Stefanello, N., de Oliveira, L.S., Mulinacci, N., Bellumori, M., Morsch, V.M., and Schetinger, M.R., 2015, Protective effect of

- rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of physiology and biochemistry*, 71 (4), 743-751,
- Nadeem, M., Imran, M., Aslam Gondal, T., Imran, A., Shahbaz, M., Muhammad Amir, R., Wasim Sajid, M., Batool Qaisrani, T., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Adrian Ostrander, E., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W.C., and Martins, N., 2019, Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review, *Applied Sciences*, 9 (15), 3139,
- Noelker, C., Morel, L., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Lescot, T., Breloer, M., Gold, M., Oertel, W.H., Henze, C., Michel, P.P., Dodel, R.C., Lu, L., Hirsch, E.C., Hunot, S., and Hartmann, A., 2014, Heat shock protein 60: an endogenous inducer of dopaminergic cell death in Parkinson disease, *Journal of neuroinflammation*, 11, 86.
- Noor, S., Mohammad, T., Rub, M.A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D.K., Hassan, M.I. and Asiri, A.M., 2022, Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid, *Archives of pharmacal research*, 45 (4), 205-228.
- Nunes, S., Madureira, A.R., Campos, D., Sarmento, B., Gomes, A.M., Pintado, M., and Reis, F., 2017, Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid-Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile, *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (9), 1799-1806.
- Ojha, J., Karmegam, R.V., Masilamoni, J.G., Terry, A.V., and Cashikar, A.G., 2011, Behavioral defects in chaperone-deficient Alzheimer's disease model mice, *PloS one*, 6 (2), e16550.
- Okamoto, Y., Shirakashi, Y., Ihara, M., Urushitani, M., Oono, M., Kawamoto, Y., Yamashita, H., Shimohama, S., Kato, S., Hirano, A., Tomimoto, H., Ito, H., and Takahashi, R., 2011, Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model, *PloS one*, 6 (5), e20427.
- Ono, K., and Yamada, M., 2006, Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro, *Journal of neurochemistry*, 97 (1), 105-115.
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D.B., Zagorski, M.G., and Yamada, M., 2012, Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding, *The Journal of biological chemistry*, 287 (18), 14631-14643,
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E.H., Ozgen, U., Duran, A., and Uygun, I., 2014, Protective effects of rosmarinic acid against renal ischemia/reperfusion injury in rats, *The Journal of the pakistan medical association*, 64 (3), 260-265.
- Park, S.G., Jung, S., Ryu, H.H., Jung, T.Y., Moon, K.S., Kim, I.Y., Jeong, Y.I., Pei, J., Park, S.J., and Kang, S.S., 2012, Role of 14-3-3-beta in the migration and invasion in human malignant glioma cell line U87MG, *Neurological research*, 34 (9), 893-900.
- Pavel, M.A., Petersen, E.N., Wang, H., Lerner, R.A., and Hansen, S.B., 2020, Studies on the mechanism of general anesthesia, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 117 (24), 13757-13766.
- Peffer, S., Gonçalves, D., and Morano, K.A., 2019, Regulation of the Hsf1-dependent transcriptome via conserved bipartite contacts with Hsp70 promotes survival in yeast, *The Journal of biological chemistry*, 294 (32), 12191-12202.

- Petersen R.C. 2004, Mild cognitive impairment as a diagnostic entity, *Journal of internal medicine*, 256 (3), 183-194.
- Petersen, M., and Simmonds, M.S., 2003, Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62 (2), 121-125.
- Petzoldt, A.G., and Sigrist, S.J., 2014, Synaptogenesis, *Current biology: CB*, 24 (22), R1076-R1080.
- Poore, C.P., Sundaram, J. R., Pareek, T.K., Fu, A., Amin, N., Mohamed, N.E., Zheng, Y.L., Goh, A.X., Lai, M.K., Ip, N.Y., Pant, H.C., and Kesavapany, S., 2010, Cdk5-mediated phosphorylation of delta-catenin regulates its localization and GluR2-mediated synaptic activity, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30 (25), 8457-8467.
- Pradeep, T., Manissery, J.J., and Upadya, M., 2017, Emergence agitation in pediatric patients using sevoflurane and isoflurane anesthesia: A randomized controlled study, *Southern african journal of anaesthesia and analgesia*, 23 (2), 32-35.
- Rahbardar, M.G., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S.J., and Hosseinzadeh, H., 2018, Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects, *Phytomedicine: International journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 40, 59-67.
- Rice, D., and Barone, S.Jr., 2000, Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models, *Environmental health perspectives*, 108 Suppl 3(Suppl 3), 511-533.
- Riedel, B., Browne, K., and Silbert, B., 2014, Cerebral protection: inflammation, endothelial dysfunction, and postoperative cognitive dysfunction, *Current opinion in anaesthesiology*, 27 (1), 89-97.
- Ritiu, S.A., Rogobete, A.F., Sandesc, D., Bedreag, O.H., Papurica, M., Popovici, S.E., Toma, D., Ivascu, R.I., Velovan, R., Garofil, D.N., Corneci, D., Bratu, L.M., Pahontu, E.M., and Pistol, A., 2022, The impact of general anesthesia on redox stability and epigenetic inflammation pathways: Crosstalk on perioperative antioxidant therapy, *Cells*, 11 (12), 1880.
- Ritossa, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*, *Experientia*, 18 (12), 571-573.
- Rizzi, S., Ori, C., and Jevtovic-Todorovic, V., 2010, Timing versus duration: determinants of anesthesia-induced developmental apoptosis in the young mammalian brain, *Annals of the new york academy of sciences*, 1199, 43-51.
- Rosenthal, M.H., 2004, Ensuring anesthesiology's place in the 21st century: A time for growth or obscurity—A FAER white paper, part 1, *ASA Monitor*, 68 (7), 36-37.
- Roux, C.M., Leger, M., and Freret, T., 2021, Memory disorders related to hippocampal function: The interest of 5-HT(4)Rs targeting, *International journal of molecular sciences*, 22 (21), 12082.
- Runtuwene, J., Cheng, K.C., Asakawa, A., Amitani, H., Amitani, M., Morinaga, A., Takimoto, Y., Kairupan, B.H., and Inui, A., 2016, Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4, *Drug design, development and therapy*, 10, 2193-2202.

- Sackey, P.V., Martling, C.R., and Radell, P.J., 2005, Three cases of PICU sedation with isoflurane delivered by the 'AnaConDa', *Paediatric anaesthesia*, 15 (10), 879-885.
- Sadik, G., Tanaka, T., Kato, K., Yamamori, H., Nessa, B.N., Morihara, T., and Takeda, M., 2009, Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of tau aggregation, *Journal of neurochemistry*, 108 (1), 33-43.
- San Gil, R., Ooi, L., Yerbury, J.J., and Ecroyd, H., 2017, The heat shock response in neurons and astroglia and its role in neurodegenerative diseases, *Molecular neurodegeneration*, 12 (1), 65.
- Sanders, R.D., Xu, J., Shu, Y., Januszewski, A., Halder, S., Fidalgo, A., Sun, P., Hossain, M., Ma, D., and Maze, M., 2009, Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats, *Anesthesiology*, 110 (5), 1077-1085.
- Sasaki, K., El Omri, A., Kondo, S., Han, J., and Isoda, H., 2013, *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation, *Behavioural brain research*, 238, 86-94,
- Scarpati, M.L., and Oriente, G., 1958, Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus officinalis*), *Rice science*, 28, 2329-2333.
- Seigneuric, R., Mjahed, H., Gobbo, J., Joly, A.L., Berthenet, K., Shirley, S., and Garrido, C., 2011, Heat shock proteins as danger signals for cancer detection, *Frontiers in oncology*, 1, 37.
- Şengelen, A., and Önay-Uçar, E., 2018, Rosmarinic acid and siRNA combined therapy represses Hsp27 (HSPB1) expression and induces apoptosis in human glioma cells, *Cell stress & chaperones*, 23 (5), 885-896.
- Şengelen, A., and Önay-Uçar, E., 2024, Rosmarinic acid attenuates glioblastoma cells and spheroids' growth and EMT/stem-like state by PTEN/PI3K/AKT downregulation and ERK-induced apoptosis, *Phytomedicine: International Journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 135, 156060.
- Senoner, T., Velik-Salchner, C., Luckner, G., and Tauber, H., 2021, Anesthesia-Induced Oxidative Stress: Are There Differences between Intravenous and Inhaled Anesthetics?, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 8782387.
- Shan, Y., Wang, D.D., Xu, Y.X., Wang, C., Cao, L., Liu, Y.S., and Zhu, C.Q., 2016, Aging as a Precipitating Factor in Chronic Restraint Stress-Induced Tau Aggregation Pathology, and the Protective Effects of Rosmarinic Acid, *Journal of alzheimer's disease: JAD*, 49 (3), 829-844.
- Shang, A.J., Yang, Y., Wang, H.Y., Tao, B.Z., Wang, J., Wang, Z.F., and Zhou, D.B., 2017, Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid, *Nutritional neuroscience*, 20 (3), 172-179.
- Sharp, F.R., Zhan, X., and Liu, D.Z., 2013, Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential, *Translational stroke research*, 4 (6), 685-692.
- Shimada, T., Fournier, A.E., and Yamagata, K., 2013, Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration, *BioMed research international*, 2013, 564534.

- Shimojo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., Shimizu, T., and Shirasawa, T., 2010, Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of neuroscience research*, 88 (4), 896-904.
- Silveira, M.A.D., Khadangi, F., Mersaoui, S.Y., Naik, D., Masson, J.Y., and Bilodeau, S., 2023, HSP70 mediates a crosstalk between the estrogen and the heat shock response pathways, *Journal of biological chemistry*, 299 (2), 102872.
- Siman, R., Giovannone, N., Toraskar, N., Frangos, S., Stein, S.C., Levine, J.M., and Kumar, M.A. 2011, Evidence that a panel of neurodegeneration biomarkers predicts vasospasm, infarction, and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *PloS one*, 6 (12), e28938.
- Siman, R., Roberts, V.L., McNeil, E., Dang, A., Bavaria, J.E., Ramchandren, S., and McGarvey, M., 2008, Biomarker evidence for mild central nervous system injury after surgically-induced circulation arrest, *Brain research*, 1213, 1-11.
- Simon, S.A., McIntosh, T.J., Bennett, P.B., and Shrivastav, B.B., 1979, Interaction of halothane with lipid bilayers, *Molecular pharmacology*, 16 (1), 163-170.
- Simpson, J.Y., 1848, Local Anaesthesia: Notes on Its Artificial Production by Chloroform, &c., in the Lower Animals, and in Man, *Provincial medical & surgical journal*, 12 (14), 365-371.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry*, 150 (1), 76-85.
- So, Y., Lee, S.Y., Han, A.R., Kim, J.B., Jeong, H.G., and Jin, C.H., 2016, Rosmarinic Acid Methyl Ester Inhibits LPS-Induced NO Production via Suppression of MyD88-Dependent and -Independent Pathways and Induction of HO-1 in RAW 264.7 Cells, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21 (8), 1083.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., and Baborun, T., 2005, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions, *Mutation research*, 579 (1-2), 200-213.
- Steckler, T., and Muir, J.L., 1996, Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds, *Brain research. cognitive brain research*, 3 (3-4), 299-308.
- Steinacker, P., Aitken, A., and Otto, M., 2011, 14-3-3 proteins in neurodegeneration, *Seminars in cell & developmental biology*, 22 (7), 696-704.
- Stetler, R.A., Cao, G., Gao, Y., Zhang, F., Wang, S., Weng, Z., Vosler, P., Zhang, L., Signore, A., Graham, S.H., and Chen, J., 2008, Hsp27 protects against ischemic brain injury via attenuation of a novel stress-response cascade upstream of mitochondrial cell death signaling, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for neuroscience*, 28 (49), 13038-13055.
- Stiegler, M.P., and Ruskin, K.J., 2012, Decision-making and safety in anesthesiology, *Current opinion in anaesthesiology*, 25 (6), 724-729.
- Stielow, M., Witczyńska, A., Kubryń, N., Fijałkowski, Ł., Nowaczyk, J., & Nowaczyk, A., 2023, The bioavailability of drugs—the current state of knowledge, *Molecules*, 28 (24), 8038.

- Stratmann, G., Bell, J., Alvi, R.S., Ku, B., Saw, L., Encarnacion, A., Magnusson, K., Bickler, P., Liu, J., 2006, Neonatal isoflurane anesthesia causes a permanent neurocognitive deficit in rats, *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 18 (4), 288.
- Sun, L.S., Li, G., Miller, T.L., Salorio, C., Byrne, M.W., Bellinger, D.C., Ing, C., Park, R., Radcliffe, J., Hays, S.R., DiMaggio, C.J., Cooper, T.J., Rauh, V., Maxwell, L.G., Youn, A., & McGowan, F.X., 2016, Association Between a Single General Anesthesia Exposure Before Age 36 Months and Neurocognitive Outcomes in Later Childhood, *JAMA*, 315 (21), 2312-2320.
- Sun, N., Chu, L., Yuan, L., Qi, Z., 2019, Inactivation of P2Y₁₂ contributes to isoflurane-induced neuronal injury by altering TLR-4/BDNF/TNF- α , *Folia neuropathologica*, 57 (2), 161-169.
- Tayebati, S.K., 2006, Animal models of cognitive dysfunction, *Mechanisms of ageing and development*, 127 (2), 100-108.
- Terrando, N., Eriksson, L.I., Ryu, J.K., Yang, T., Monaco, C., Feldmann, M., Jonsson Fagerlund, M., Charo, I.F., Akassoglou, K., and Maze, M., 2011, Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline, *Annals of neurology*, 70 (6), 986-995.
- Toyo-Oka, K., Wachi, T., Hunt, R.F., Baraban, S.C., Taya, S., Ramshaw, H., Kaibuchi, K., Schwarz, Q.P., Lopez, A.F., and Wynshaw-Boris, A., 2014, 14-3-3 ϵ and ζ regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain, *The Journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience*, 34 (36), 12168-12181.
- Trivedi S., 2007, Heat shock proteins and neuroprotection, *Recent patents on DNA & gene sequences*, 1 (2), 134-137.
- Tsukamoto, A., Uchida, K., Maesato, S., Sato, R., Kanai, E., and Inomata, T., 2016, Combining isoflurane anesthesia with midazolam and butorphanol in rats, *Experimental animals*, 65 (3), 223-230.
- Turturici, G., Sconzo, G., and Geraci, F., 2011, Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases, *Biochemistry research international*, 2011, 618127.
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., Asea, A., Savettieri, G., Ragonese, P., and Geraci, F., 2014, Positive or negative involvement of heat shock proteins in multiple sclerosis pathogenesis: an overview, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 73 (12), 1092-1106.
- Uddin, M.A., Akhter, M.S., Kubra, K.T., Whitaker, K.E., Shipley, S.L., Smith, L.M., and Barabutis, N., 2021, Hsp90 inhibition protects the brain microvascular endothelium against oxidative stress, *Brain disorders (Amsterdam, Netherlands)*, 1, 100001.
- Vacas, S., Degos, V., Feng, X., and Maze, M. 2013 The neuroinflammatory response of postoperative cognitive decline. *British medical bulletin*, 106 (1), 161-178.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P., 2001, 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23 (10), 936-946.
- Vizcaychipi, M. P., Xu, L., Barreto, G. E., Ma, D., Maze, M., and Giffard, R. G., 2011, Heat shock protein 72 overexpression prevents early postoperative memory decline after orthopedic surgery under general anesthesia in mice, *Anesthesiology*, 114 (4), 891-900.

- Vorhees, C. V., and Williams, M. T., 2006, Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nature protocols*, 1 (2), 848-858.
- Wachi, T., Cornell, B., Marshall, C., Zhukarev, V., Baas, P.W., and Toyo-Oka, K., 2016, Ablation of the 14-3-3gamma Protein Results in Neuronal Migration Delay and Morphological Defects in the Developing Cerebral Cortex, *Developmental neurobiology*, 76 (6), 600-614.
- Wade, J.G., and Stevens, W.C., 1981, Isoflurane: an anesthetic for the eighties?, *Anesthesia and analgesia*, 60 (9), 666-682.
- Walker, J.M., 2002b, *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M. (ed.), Chapter 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-
- Walker, J.M., 2002a, *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M. (ed.), Chapter 3, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 11-14.
- Walters, J.L., and Paule, M.G., 2017, Review of preclinical studies on pediatric general anesthesia-induced developmental neurotoxicity, *Neurotoxicology and teratology*, 60, 2-23.
- Wang, D., Chen, P., Chen, L., Zeng, F., Zang, R., Liu, H., and Lu, C., 2017, Betulinic acid protects the neuronal damage in newborn rats from isoflurane-induced apoptosis in the developing brain by blocking FASL-FAS signaling pathway, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 95, 1631-1635.
- Wang, J., Lou, H., Pedersen, C.J., Smith, A.D., and Perez, R.G., 2009, 14-3-3zeta contributes to tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells: localization of dopamine regulatory proteins to mitochondria, *The Journal of biological chemistry*, 284 (21), 14011-14019.
- Wang, N., Lu, Y., Wang, K., Li, W.S., Lu, P., Lei, S., Li, R., Zhang, H., Zheng, J., Lu, H.X., Chen, X.L., Liu, Y., and Zhang, P.B., 2018, Simvastatin attenuates neurogenetic damage and improves neurocognitive deficits induced by isoflurane in neonatal rats, *Cell physiology and biochemistry*, 46, 618-632.
- Wang, X., Xu, Z., and Miao, C. H., 2014, Current clinical evidence on the effect of general anesthesia on neurodevelopment in children: an updated systematic review with meta-regression, *Plos one*, 9 (1), e85760.
- Warner, D.O., Zaccariello, M.J., Katusic, S.K., Schroeder, D.R., Hanson, A.C., Schulte, P.J., Buenvenida, S.L., Gleich, S.J., Wilder, R.T., Sprung, J., Hu, D., Voigt, R.G., Paule, M.G., Chelonis, J.J., and Flick, R.P., 2018, Neuropsychological and Behavioral Outcomes after Exposure of Young Children to Procedures Requiring General Anesthesia: The Mayo Anesthesia Safety in Kids (MASK) Study, *Anesthesiology*, 129 (1), 89-105.
- Wilder, R.T., Flick, R.P., Sprung, J., Katusic, S.K., Barbaresi, W.J., Mickelson, C., Gleich, S. J., Schroeder, D.R., Weaver, A.L., and Warner, D.O., 2009, Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort, *Anesthesiology*, 110 (4), 796-804.
- Wilhelmus, M.M., Boelens, W.C., Otte-Höller, I., Kamps, B., Kusters, B., Maat-Schieman, M.L., de Waal, R.M., and Verbeek, M.M., 2006, Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid-beta protein

- aggregation and cerebrovascular amyloid-beta toxicity, *Acta neuropathologica*, 111 (2), 139-149.
- Winterberg, A.V., Colella, C.L., Weber, K.A., and Varughese, A.M., 2018, The Child Induction Behavioral Assessment Tool: A Tool to Facilitate the Electronic Documentation of Behavioral Responses to Anesthesia Inductions, *Journal of perianesthesia nursing: official journal of the american society of perianesthesia nurses*, 33 (3), 296-303.e1.
- Wise-Faberowski, L., Zhang, H., Ing, R., Pearlstein, R.D., and Warner, D.S., 2005, Isoflurane-induced neuronal degeneration: an evaluation in organotypic hippocampal slice cultures, *Anesthesia and analgesia*, 101 (3), 651-657.
- Witt S.N., 2013, Molecular chaperones, α -synuclein, and neurodegeneration, *Molecular neurobiology*, 47 (2), 552-560.
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., and Wang, Y., 2023, The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery, *Signal transduction and targeted therapy*, 8 (1), 217.
- Xia, Y., Sun, X., Luo, Y., and Sary, C.M., 2019, Ferroptosis contributes to isoflurane neurotoxicity, *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 486.
- Yacoubian, T.A., Slone, S.R., Harrington, A.J., Hamamichi, S., Schieltz, J.M., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., and Standaert, D.G., 2010, Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease, *Cell death & disease*, 1 (1), e2.
- Yadav, U.C., and Ramana, K.V., 2013, Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 690545.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C., 1997, The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity, *Cell*, 91 (7), 961-971.
- Yerbury, J.J., Ooi, L., Dillin, A., Saunders, D.N., Hatters, D.M., Beart, P.M., Cashman, N.R., Wilson, M. R., and Ecroyd, H., 2016, Walking the tightrope: proteostasis and neurodegenerative disease, *Journal of neurochemistry*, 137 (4), 489-505.
- Yilmaz, H., Şengelen, A., Demirgan, S., Paşaoğlu, H. E., Çağatay, M., Erman, İ. E., Bay, M., Güneşli, H. C., and Önay-Uçar, E., 2023, Acutely increased aquaporin-4 exhibits more potent protective effects in the cortex against single and repeated isoflurane-induced neurotoxicity in the developing rat brain, *Toxicology mechanisms and methods*, 33 (4), 279-292.
- Yon, J.H., Daniel-Johnson, J., Carter, L.B., and Jevtovic-Todorovic, V., 2005, Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, *Neuroscience*, 135 (3), 815-827.
- Zhang, J., Chen, B., Deng, X., Wang, B., and Liu, H., 2019, Neonatal exposure to the experimental environment or ketamine can induce long-term learning dysfunction or overmyelination in female but not male rats, *Neuroreport*, 30 (7), 491-497.
- Zhang, Y., Dong, Y., Wu, X., Lu, Y., Xu, Z., Knapp, A., Yue, Y., Xu, T., and Xie, Z., 2010, The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 285 (6), 4025-4037.

- Zhao, S., Fan, Z., Hu, J., Zhu, Y., Lin, C., Shen, T., Li, Z., Li, K., Liu, Z., Chen, Y., and Zhang, B., 2020, The differential effects of isoflurane and sevoflurane on neonatal mice, *Scientific reports*, 10 (1), 19345.
- Zheng, Z., Wu, Y., Li, Z., Ye, L., Lu, Q., Zhou, Y., Yuan, Y., Jiang, T., Xie, L., Liu, Y., Chen, D., Ye, J., Nimlamool, W., Zhang, H., and Xiao, J., 2020, Valproic acid affects neuronal fate and microglial function via enhancing autophagic flux in mice after traumatic brain injury, *Journal of neurochemistry*, 154 (3), 284-300.
- Zhou, H., Xie, Z., Brambrink, A.M., Yang, G., 2021, Behavioural impairments after exposure of neonatal mice to propofol are accompanied by reductions in neuronal activity in cortical circuitry, *British Journal of anaesthesia*, 126 (6), 1141-1156.
- Zhou, X., Wang, W., Li, Z., Chen, L., Wen, C., Ruan, Q., Xu, Z., Liu, R., Xu, J., Bai, Y., and Deng, J., 2022, Rosmarinic Acid Decreases the Malignancy of Pancreatic Cancer Through Inhibiting Gli1 Signaling, *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 95, 153861.
- Zhou, Z.B., Huang, G. X., Lu, J.J., Ma, J., Yuan, Q.J., Cao, Y., and Zhu, L., 2019, Up-regulation of heat shock protein 27 inhibits apoptosis in lumbosacral nerve root avulsion-induced neurons, *Scientific reports*, 9 (1), 11468.

EKLER**EK1: Etik izin belgesi**

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 2021/ 79
Konu : HADYEK/2021-11 nolu Proje
110. Kurul toplantısı

03.05.2021

Sayın, Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yürütücüsü olduğunuz “Rosmarinik Asidin İzoflurana Bağlı Apoptoz ve Kognitif Disfonksiyon Üzerine Etkileri” isimli projeniz Hastanemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna vermiş olduğunuz 2021- 27 sayılı dilekçeniz incelenmiştir. Alınan karar gereğince projenin onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ayşın SELCAN
HADYEK Başkanı

SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

26.04.2021

2021-11 NOLU PROJENİN 26.04.2021 TARİHLİ VE 110. KURUL TOPLANTI KARARI

Prof. Dr. Aysin SELCAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı
(Proje Görüşülürken yoktu)

Prof. Dr. Feyza KARAGÖZ GÜZEY
Nöroşirürji Kliniği

Prof. Dr. Mehmet Faruk OKTAY
Kulak Burun Boğaz Kliniği

Doç. Dr. Ozan BEYTEMÜR
Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği

Doç. Dr. Berk ÖZKAYNAK
Kardiyovasküler Cerrahi Kliniği

Doç. Dr. Osman Bilgin GÜLÇİÇEK
Genel Cerrahi Kliniği

Duygu Sultan ORAN
Veteriner Hekim
(Proje Görüşülürken yoktu)

Kadir TECİRLİ
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Ayşe AY
Sivil Bir Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Serdar DEMİRGAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	İstanbul Tıp Fakültesi
Bölümü	Tıp
Mezuniyet Yılı	19.07.2005

Yüksek Lisans	
Üniversite	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Enstitü Adı	İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Anabilim Dalı	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Programı	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzmanlık Eğitimi

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Akyol, O., Demirhan, S., Şengelen, A., Güneyli, H.C., Oran, D.S., Yıldırım, F., Haktanır, D., Sevdı, M.S., Erkalp, K., and Selcan, A., 2022, Mild hypothermia via external cooling improves lung function and alleviates pulmonary inflammatory response and damage in two-hit rabbit model of acute lung injury, <i>Journal of investigative surgery</i> , 35(7), 1472-1483.	
Demirhan, S., Akyol, O., Temel, Z., Şengelen, A., Pekmez, M., Demirhan, R., Sevdı, M.S., Erkalp, K., and Selcan, A., 2019, Isoflurane exposure in infant rats acutely increases aquaporin 4 and does not cause neurocognitive impairment, <i>Bosnian journal of basic medical sciences</i> , 19(3), 257-264.	
Demirhan, S., Karacan, G., Solak, S.K., Akyüz, B., Akpolat, H., and Selcan, A., 2024, Anaesthesia Management of A Patient with Airway Obstruction Caused by	

Prosthetic Vascular Graft Invasion into the Tracheal Lumen, *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*, 52(5), 196.

Glasbey, J.C., Abbott, T.E., Ademuyiwa, A., Adisa, A., Alameer, E., Alshryda, S., et al., 2022, Elective surgery system strengthening: development, measurement, and validation of the surgical preparedness index across 1632 hospitals in 119 countries, *The Lancet*, 400(10363), 1607-1617.

Kargı-Gemici, E., Şengelen, A., Aksüt, Y., Akyol, O., Şengiz-Erhan, S., Bay, M., Önay-Uçar, E., Selcan, A., and Demirgan, S., 2024, Cerium oxide nanoparticles (nanoceria) pretreatment attenuates cell death in the hippocampus and cognitive dysfunction due to repeated isoflurane anesthesia in newborn rats, *Neurotoxicology*, 105, 82-93.

Sevdi, M.S., Demirgan, S., Erkalp, K., Akyol, O., Ozcan, F.G., Guneyli, H.C., Tunalı, M.C., and Selcan, A., 2022, Continuous endotracheal tube cuff pressure control decreases incidence of ventilator-associated pneumonia in patients with traumatic brain injury, *Journal of investigative surgery*, 35(3), 525-530.

Solak, S.K., Demirgan, S., Karali, E., and Selcan, A., 2024, Effect of needle types and diameters using in spinal anesthesia on optic nerve sheath diameter: Prospective randomized study, *Medicine*, 103(41), e40003.

Solmaz, A., Demirgan, S., Burcu, B., Caliskan, O., Yagcı, S., Yılmaz, Ö., and Hacım, N.A., 2024, Effect of Reverse Trendelenburg Position Applied Before Pneumoperitoneum on Optic Nerve Sheath Diameter in Laparoscopic Bariatric Surgery: A Randomized, Controlled Study, *Bariatric surgical practice and patient care*, 19(1), 50-57.

Win, M., Erkalp, K., Demirgan, S., Ozcan, F. G., Sevdi, M. S., and Selcan, A., 2023, Comparison of the Patients with Diabetes Mellitus using Either Insulin or Oral Antidiabetic Drug in Terms of Difficult Laryngoscopy: A Randomized Controlled Study, *Nigerian journal of clinical practice*, 26(10), 1423-1429.

Yılmaz, H., Şengelen, A., Demirgan, S., Paşaoğlu, H.E., Çağatay, M., Erman, İ.E., Bay, M., Güneşli, H.C., and Önay-Uçar, E., 2023, Acutely increased aquaporin-4 exhibits more potent protective effects in the cortex against single and repeated isoflurane-induced neurotoxicity in the developing rat brain, *Toxicology mechanisms and methods*, 33(4), 279-292.