



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**YENİDOĞAN SIÇAN BEYNİNDE HİPEROKSİNİN NEDEN  
OLDUĞU NÖRON ÖLÜMÜNDE NESFATİN-1 PEPTİTİNİN  
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**KIYMET ZÜLAL HALK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2023**

KIYMET ZÜLAL HALK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**YENİDOĞAN SIÇAN BEYNİNDE HİPEROKSİNİN NEDEN OLDUĞU  
NÖRON ÖLÜMÜNDE NESFATİN-1 PEPTİTİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kıymet Zülal HALK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Fatma Zehra MİN BAY**

**HDP(T)-2020/26 ve TGA-2022-1173 B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler**

**Koordinasyon Birimi**

**BURSA-2023**

**T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “**Yenidoğan Sıçan Beyninde Hiperoksinin Neden Olduğu Nöron Ölümünde Nesfatin-1 Peptidinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Kıymet Zülal HALK**  
**Tarih ve İmza**

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

/ /

**Adı Soyadı:** Kıymet Zülal HALK

**Anabilim Dalı:** Tıp-Histoloji ve Embriyoloji AbD

**Tez Konusu:** Yenidoğan Sıçan Beyninde Hiperoksinin Neden Olduğu Nöron Ölümünde Nesfatin-1 Peptitinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

<b><u>ÖZELLİKLER</u></b>	<b><u>UYGUNDUR</u></b>	<b><u>UYGUN DEĞİLDİR</u></b>	<b><u>ACIKLAMA</u></b>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### **DANIŞMAN ONAYI**

**Unvanı Adı Soyadı:**

Prof. Dr. Fatma Zehra MİNBAŸ

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

<b>DIŞ KAPAK</b>	
<b>İÇ KAPAK</b>	
<b>ETİK BEYANI</b> .....	<b>II</b>
<b>KABUL ONAY SAYFASI</b> .....	<b>III</b>
<b>TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	<b>VII</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. İnsanlarda ve Kemirgenlerde Sinir Dokunun Temel Gelişim Süreçleri .....	3
2.2. Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarı Deneysel Modelleri .....	7
2.2.1 Hiperoksi ve Oksidatif Stres .....	8
2.2.2. Hiperoksi ve Otofaji.....	9
2.2.3. Hiperoksi ve Nörotrofinler .....	15
2.2.4. Hiperoksi ve Nöroenflamasyon.....	16
2.2.5. Hiperoksi ve Apoptoz .....	17
2.3. Nesfatin .....	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>23</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	23
3.2. Çalışma Protokolü ve Deney Grupları .....	24
3.3. Hiperoksik Beyin Hasarının Oluşturulması .....	26
3.4. Beyin Dokularının Eldesi .....	26
3.5. Işık Mikroskopik Preparasyon .....	27
3.5.1. Krezil Violet Boyaması.....	28
3.6. Moleküler Analizler .....	29
3.6.1. Western Blotting protokolü.....	29
3.6.2. ELİSA .....	32
3.7 İstatistiksel Analiz.....	33
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>34</b>
4.1. Nesfatin-1 Peptinin Yeni Doğan Sıçan Hiperoksik beyin hasarında Korteks Nöron Sayısı Üzerine Etkisi.....	34
4.2. Nesfatin-1 Peptinin Yeni Doğan Sıçan Hiperoksik Beyin Hasarında Miyelinizasyon Üzerine Etkisi.....	38
4.3. Nesfatin-1 Peptinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Otofaji Üzerine Etkisi .....	42
4.4. Nesfatin-1 Peptinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Apoptoz Üzerine Etkisi.....	45
4.5. Nesfatin-1 Peptinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Nöroenflamasyon Üzerine Etkisi .....	47

4.6. Nesfatin-1 Peptininin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Nörotrofinler Üzerine Etkisi.....	48
4.5. Nesfatin-1 Peptininin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	50
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>75</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>77</b>
<b>9. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>79</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>80</b>



## TÜRKÇE ÖZET

Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde prematür yenidoğanlara, resüsitasyon pulmoner hipertansiyon ve solunum sıkıntısı gibi durumlarda tedavi amaçlı verilen suprafizyolojik dozlarda oksijen, retina ve akciğer gibi organların yanısıra beyine de hasar verir. Hiperoksinin apoptoz, oksidatif stres, inflamasyon gibi nöronal sağkalımı etkileyen süreçlerde patolojik değişikliklere neden olduğu neonatal hayvan modellerinde gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar hiperoksinin neden olduğu nöronal hasarı azaltmayı amaçlayan nöroprotektif ajan arayışları üzerine yoğunlaşmıştır. Anoreksijenik bir peptid olan nesfatin-1'in, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkileri olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, nesfatin-1 peptidinin gelişmekte olan sıçan beyinde hiperoksinin neden olduğu beyin hasarına etkisinin olup olmadığını ve bu etkisini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektir.

Çalışmada *Wistar albino* cinsi 6 günlük sıçanlar kullanıldı. Normoksi+SF, hiperoksi+SF, hiperoksi+nesfatin-1, normoksi+nesfatin-1, grupları oluşturuldu. 2 veya 5 gün sürelerle hiperoksiye maruz bırakılan yavrulara iki farklı dozda nesfatin-1 intraperitoneal yolla verildi. Işık mikroskopik değerlendirmelerde etkin dozun 20µg/kg/gün olduğu belirlendi. Takiben etkin doz verilen yavru sıçanların tüm beyin homojenatlarında, otofaji, apoptoz, inflamasyon ve oksidatif stres süreçlerine özgü proteinler ile nörotrofinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirildi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, nesfatin-1'in, hiperoksi nedeniyle azalan nöron sayısını anlamlı ölçüde artırdığı ve hipomiyelizasyonu düzelttiği gözlemlendi. İki günlük hiperoksi süresince uygulanan nesfatin-1'in, hiperoksinin nedeni ile artan beclin-1, ATG5 ve LC3A-B gibi otofaji belirteçlerinin düzeyleri ile BAX ve IL-18 ekspresyonlarını anlamlı ölçüde azaltırken, 5 günlük hiperoksinin etkisi ile ekspresyonları azalan BDNF ve GDNF gibi nörotrofinler ile SOD ve GSH-Px antioksidan enzim düzeylerini anlamlı olarak artırdığı tespit edildi.

Sonuç olarak, nesfatin-1 peptidinin hiperoksinin neden olduğu beyin hasarını azalttığı, bozulan hücresel ve moleküler mekanizmalar üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, hiperoksi, nesfatin-1, nöron korunması, otofaji

## İNGİLİZCE ÖZET

### INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF NESFATIN-1 PEPTIDE IN NEURON DEATH CAUSED BY HYPEROXIA IN NEWBORN RAT BRAIN

Supraphysiological doses of oxygen given to premature newborns in neonatal intensive care units for treatment purposes in conditions such as resuscitation, pulmonary hypertension and respiratory distress, damage the brain as well as organs such as the retina and lungs. It has been shown in neonatal animal models that hyperoxia causes pathological changes in processes affecting neuronal survival such as apoptosis, oxidative stress, and inflammation. Studies in recent years have focused on the search for neuroprotective agents aiming to reduce neuronal damage caused by hyperoxia. There are studies demonstrating that nesfatin-1, an endogenous anorexigenic peptide, has anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. The aim of this study is to show whether nesfatin-1 peptide has an effect on brain damage caused by hyperoxia in the developing rat brain and through which mechanisms it exerts this effect.

Six-day-old *Wistar albino* rat pups were used in the study. Normoxia+SF, hyperoxia+SF, hyperoxia+nesfatin, normoxia+nesfatin groups were created. Two different doses of nesfatin-1 were given intraperitoneally to rat pups exposed to hyperoxia for 2 or 5 days. Subsequently, changes in the expression of proteins specific to autophagy, apoptosis, inflammation and oxidative stress processes and neurotrophins were evaluated in the whole brain homogenates of rat pups given the effective dose.

According to our findings, nesfatin-1 significantly increased the number of neurons decreased due to hyperoxia and restored myelination. Nesfatin-1 applied during two days of hyperoxia significantly reduced the levels of autophagy markers such as beclin-1, ATG5 and LC3A-B, which increased due to hyperoxia, and the protein expressions of BAX and IL-18. It was also found that neurotrophins such as BDNF and GDNF or SOD and GSH-Px antioxidant enzyme levels, whose expressions decreased with the effect of 5-day hyperoxia, significantly increased.

In conclusion, it has been shown that nesfatin-1 peptide reduces brain damage caused by hyperoxia and has a protective effect on impaired cellular and molecular mechanisms.

**Key Words:** Apoptosis, autophagy, hyperoxia, nesfatin-1, neuron protection.

**BUĞ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA**  
**HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ\***



Doktora tezi olarak sunduğum “Yenidoğan Sıçan Beyninde Hiperoksinin Neden Olduğu Nöron Ölümünde Nesfatin-1 Peptinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez 3. Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

## 1. GİRİŞ

Yenidoğanda beynin gelişimi ve hücrelerin devamlılığı için sinir dokusuna sunulan kan akımı düzeyinin ve oksijen konsantrasyonunun yeterli olması önemlidir. Bu nedenle özellikle preterm yenidoğanlarda resüsitasyon ve solunum sıkıntısı gibi durumlarda oksijen, teröpatik ajan olarak kullanılmaktadır. Suprafizyolojik dozlarda kullanılan oksijen, prematüre yenidoğanlarda semptomları iyileştirip sağkalımı artırmasına karşın, sinir sistemi ve akciğer gelişimini olumsuz etkileyerek, yaşamın sonraki dönemlerinde prematürite retinopatisi ve bronkopulmoner displazi gibi hastalıklarının gelişmesinde temel faktör olarak kabul edilmektedir. Yüksek oksijen konsantrasyonu, beyinde apoptoz ve otofaji, nörotrofin ve nörotransmitter salınımı, reaktif oksijen türleri (ROS) ve ROS-bağımlı sistemler ve enflamasyon gibi biyokimyasal, moleküler ve hücrel mekanizmalara etki ederek sinir dokusunun gelişimini bozmaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması, hiperoksiyle sekonder gelişen hasarın ve uzun vadeli sekellerin tanımlanması ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Son yıllarda literatürde hiperoksi oluşturulan yenidoğan deneysel hayvan modellerinde, nöronal hasarı azaltmayı amaçlayan nöroprotektif ajan arayışlarının yoğunlaştığı görülmektedir (Bendix, ve ark., 2012; Endesfelder ve ark., 2017a, b; Goren ve ark., 2017; Sifringer ve ark., 2009, 2010). Eritropoietin (Sifringer ve ark., 2009, 2010; Bendix ve ark., 2012; Murray ve ark., 2020), kafein (Endesfelder ve ark., 2017b), TRP601 (Sifringer ve ark., 2012), deksmedetomidin (Sifringer ve ark., 2015), üridin'in (Al, Çakir, Koç, Cansev, & Alkan, 2020; Goren ve ark., 2017) yenidoğan sıçan yavrularında oluşturulan hiperoksik hasarda koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. 2006 yılında tanımlanan (Oh-I ve ark., 2006) ve merkezi ve periferik organlarda eksprese edilen nesfatin-1 peptidi, organizmada, başta besin alımı olmak üzere (Oh-I ve ark., 2006), depresyon ve anksiyete gelişimi (Merali, Cayer, Kent & Anisman, 2008; Ge ve ark., 2015), kalp kontraktilesi (Angelone ve ark., 2013; Yamawaki ve ark., 2012), kardiyoproteksiyon (Angelone ve ark., 2013; Tasatargil ve ark., 2017), bağırsak motilitesi (Atsuchi ve ark., 2010; Gao ve ark., 2017), gonadal gelişim, gebelik (García-Galiano ve ark., 2012; Legg-St Pierre ve ark., 2018) glukoz metabolizması (Bonnet ve ark., 2013; Dong, Guan, Jiang, & Chen, 2014) ve termojenez (Dore ve ark., 2017a) gibi fizyolojik çok sayıda süreçte etki ettiği

bilinmektedir. Son yıllarda nesfatin-1'in enflamasyon ve enfeksiyona yanıtta da rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Bonnet ve ark., 2009). Subaraknoid kanamaya bağlı akut beyin hasarı (Özsavcı ve ark., 2011), travmatik beyin hasarı (Tang, Fu, Xu, Wei, & Pan, 2012) ve iskemik nöronal hasar oluşturulan erişkin hayvan modellerinde, nesfatin-1 peptitinin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkilerinin olduğu ve kaspaz-3 ve mikrogial aktivasyonu baskılayarak CA1 bölgesinde nöron ölümünü azalttığı ve uzamsal hafıza bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Erfani ve ark., 2019).

Nesfatin-1'in, erişkin deney hayvanlarında farklı yöntemlerle oluşturulan beyin hasarında nöroprotektif etkisi olduğunu gösteren literatür bilgisi kapsamında "Nesfatin-1, yenidoğan sıçan yavrularında hiperoksi ile indüklenen nöron ölümüne karşı farklı hücrel mekanizmalar üzerinden koruyucu etki gösterir" hipotezinden hareket ederek nesfatin-1 peptitinin gelişmekte olan sıçan beyinde hiperoksinin neden olduğu beyin hasarında etkisinin olup olmadığını ve bu etkisini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiğini gösterilmesi amaçlanmıştır. İki özgün hedef doğrultusunda düzenlenen deneysel çalışmalar ile amaca ulaşılması planlanmıştır: 1) Nesfatin-1 peptitinin hiperoksinin neden olduğu beyin hasarında koruyucu etkisinin olup olmadığını ve etkin dozunu belirlemek, 2) Nesfatin-1 peptitinin koruyucu etkisini hiperoksinin etkilediği hangi hücrel mekanizmalar üzerinden gösterdiğini belirlemek.

Tamamlanan tez çalışması, nesfatin-1 peptitinin, gelişmekte olan sıçan beyinde hiperoksi ile indüklenen nöron ölümünü azaltarak nöroprotektif etkiye sahip olduğunu ve bu etkisini hiperoksik koşullarda bozulan hücrel ve moleküler mekanizmalardan bazılarını iyileştirerek gerçekleştirdiğini göstermiştir. Tez çalışmasının çıktıları, yenidoğan beyin hasarında tek başına veya kombin tedavilerde nesfatin-1'in uygulanabilirliğini araştıran yeni araştırmaların tasarlanması ve efektif yeni tedavi protokollerinin oluşturulabilmesinin önünü açabilecek ön veriler sunması, ek olarak, nesfatin-1'in yenidoğanda hiperoksi ile bozulan hücrel ve moleküler mekanizmalarda etkinliğini gösteren literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle özgün değer taşımaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Vücut ağırlığının ancak %2'sini temsil eden ve bütün vücut tarafından kullanılan oksijenin %20'sini sarfetmesi nedeniyle organizmadaki en yüksek oksijen tüketen organlardan biri olan beyine ulaşan kan akımındaki azalma ve/veya sinir dokusuna sunulan oksijen yoğunluğundaki düşüş, yenidoğanda çeşitli patolojilere neden olabilmektedir. Bu nedenle oksijen, yenidoğanda beynin gelişimi ve hücrelerin devamlılığı için teröpatik ajan olarak kullanılmaktadır (Terraneo ve ark., 2017). Tüm canlı doğumların yaklaşık %5,5-11,4'ünü oluşturan prematüre doğumlar, obstetrik ve neonatal tıp alanındaki tüm gelişmelere karşın, yenidoğanda mortalite ve morbidite riskini arttıran bir problemdir. Prematüre yenidoğanların bir kısmı yoğun bakım ünitelerinde suprafizyolojik dozlarda oksijen desteğine ihtiyaç duymaktadır. Uygulanan oksijen tedavisinin hipoksinin neden olduğu semptomları iyileştirmesine karşın, prematürite retinopatisine neden olarak ciddi görme bozukluğu ve körlüğe yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir (Reich Hoeber, Bendix, & Felderhoff-Mueser, 2017). Ayrıca akciğer gelişimini de olumsuz etkileyen oksijen, yenidoğanda bronkopulmoner displazinin patogeneziindeki temel faktörlerden biri olarak tanımlanmıştır (Day, & Ryan, 2017).

Memeli beyninin gelişimi, nöronal hücre gelişimi ve proliferasyonu, migrasyonu, glial hücre proliferasyonu, aksonal ve dendritik büyüme, sinaptogenez ve aksonların miyelinizasyonu gibi yapısal ve fonksiyonel olgunlaşma süreçlerini içeren dinamik bir süreçtir (Stiles, & Jernigan, 2010). Bu nedenle yenidoğandaki beyin hasarının karakteristiği erişkindekinden farklı olmakla birlikte nöronal ve nöronal olmayan yapıların etkilenme düzeyi, hasarın olduğu gelişimsel evreye göre de değişiklik göstermektedir (Jensen, Garnier, Middelanis, & Berger, 2003).

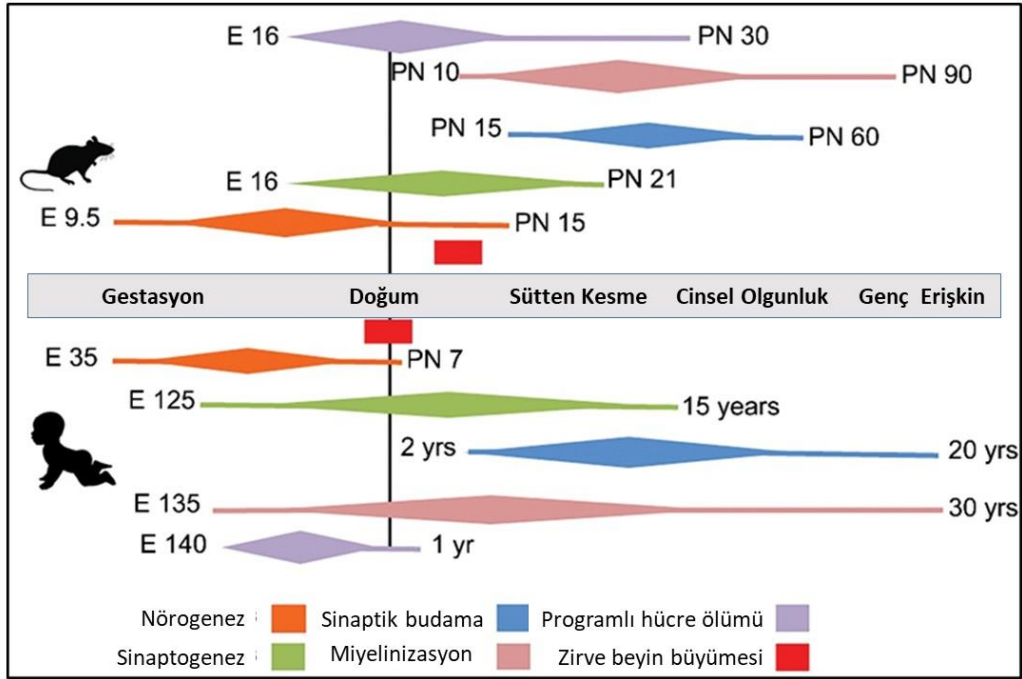
### 2.1. İnsanlarda ve Kemirgenlerde Sinir Dokunun Temel Gelişim Süreçleri

Beyin olgunlaşmasındaki kilit olayların sırası, insanlar ve kemirgenler arasında büyük ölçüde benzer olsada, zamanlama açısından önemli ölçüde farklılık gösterirler (Semple, Blomgren, Gimlin, Ferriero, & Noble-Haeusslein, 2013) (Tablo 1).

**Tablo 1.** İnsanlarda ve kemirgenlerde benzer yaşlardaki temel gelişim süreçleri (Semple ve ark., 2013).

İnsan	Kemirgen	Gelişimsel kilometre taşları
23–32 haftalık gebelik (erken doğmuş bebek)	P1–P3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Oligodendrosit olgunlaşma durumu değişiklikleri - Mitotik aktif pre-OL'lerin baskınlığı</li><li>• Bağışıklık sistemi gelişimi.</li><li>• Kan-beyin bariyerinin kurulması.</li></ul>
36–40 haftalık gebelik (term bebek)	P7–P10	<ul style="list-style-type: none"><li>• En yoğun beyin büyümesi.</li><li>• Gliogenezde zirve.</li><li>• Artan aksonal ve dendritik yoğunluk.</li><li>• Oligodendrosit olgunlaşma durumu değişir - olgunlaşmamış OL'lerin baskınlığı</li><li>• Bağışıklık sisteminin konsolidasyonu.</li></ul>
2–3 yaş	P20–P21	<ul style="list-style-type: none"><li>• Beyin yetişkin ağırlığının %90–95'ine ulaşır.</li><li>• Sinaptik yoğunlukta zirve (%50&gt; yetişkin seviyesi).</li><li>• Miyelinizasyon oranında zirve.</li><li>• Nörotransmitter ve reseptör değişiklikleri.</li></ul>
4–11 yaş 5	P25–P3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prefrontal korteks sinir ağlarının fraksiyonlanması/özelleşmesi (yapısal olgunlaşma).</li><li>• Maksimum gri madde hacmi ve kortikal kalınlık.</li></ul>
12–18 yaş	P35–P49	<ul style="list-style-type: none"><li>• Azalan sinaps yoğunluğu, yetişkin düzeylerinde bir platoya ulaşır.</li><li>• Bilişsel bağımlı devrelerin iyileştirilmesi.</li><li>• Devam eden miyelinizasyon; artan beyaz madde hacmi ve fraksiyonel anizotropi.</li></ul>
20 yaş +	P60+	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yetişkin nörotransmitter seviyeleri.</li><li>• Sinaptik yoğunluk yetişkin seviyelerinde.</li><li>• Devam eden miyelinizasyon ve azalan gri madde.</li></ul>

Omurgalılarda merkezi sinir sistemi (MSS) gelişimi, ektoderm kökenli bir doku kıvrımı olan nöral tüp oluşumu ile başlar. Bu süreç, insanlarda 266-280 günlük (40 hafta) gebelik döneminin 24.-28. günleri (3-4 hafta), sıçanlarda ise 20-21 günlük gebelik süresinin 10,5-11 gebelik günleri (gd) arasında meydana gelir. (Rice, & Barone, 2000). Sıçanlarda, kortikal ve subkortikal bölgedeki nöron üretimi (nörogenez) gd 9,5'te başlar ve postnatal (P) 15. günde tamamlanır (Babikian ve ark., 2011; Rice, & Barone, 2000). İnsanlarda, ağırlıklı olarak gebelik sırasında oluşan kortikal nörogenez 2,5 yaşına kadar devam edebilir (Prins, & Hovda, 1998) (Şekil 1). Gerek kemirgenlerde gerekse insanlarda hipokampus perinatal dönemde gelişir. Sıçanlarda hipokampal piramidal hücrelerin çoğu doğum öncesi üretilirken, dentat girusun granül hücrelerinin sadece %15'i doğumda mevcuttur (Dimonond, 1990). Buna karşılık, primatlarda dentat girus granül hücrelerinin %80'i doğumdan önce üretilmiştir (Rakic, & Nowakowski, 1981).



Şekil 1. Sıçan ve insanda başlıca MSS gelişim süreçleri (Zeiss, 2021)

İnsanlarda doğumla birlikte radyal glia, glial fibriler protein (GFAP) eksprese eden astrositlere farklılaşmaya başlar (Kriegstein, & Alvarez-Buylla, 2009; Sanità ve ark., 2014). Doğum sonrası erken haftalarda yeni astrositlerin ve oligodendrositlerin başka bir kaynağı lateral ventriküllerin subventriküler bölgesidir (SVZ). SVZ neokorteks de dahil olmak üzere üstteki yapılara doğru radyal olarak göç eden hücreler üretir (Marshall, Suzuki, & Goldman, 2003). Sıçanlarda astrositler, doğumdan sonraki ilk birkaç haftada hızlı bir olgunlaşma dönemine girer (Zhou, Schools, & Kimelberg, 2006). Hipokampustaki GFAP-pozitif hücre sayılarındaki en büyük artış P11- P16'da gözlenirken, yetişkindeki değerlere bir aylıkken ulaşmaktadır (Zhou ve ark., 2006).

Sinaptogenez, nöronlar arasında sinaps oluşumunu sağlayan biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri ifade eder. Sinaptogenez esnasında, memelilerde doğumda mevcut olan nöronlarda öncelikle sinaptik yoğunluğu artırmak için arborizasyonların ve sinaptik temasların aşırı üretimi gözlenir, ardından eliminasyon ya da budama yoluyla gerçekleştirilen bir tasfiye dönemi gelir. Fazla sinapsların tasfiye edilmesi, plastisiteye katkıda bulunan ve yetişkin bilişinin daha verimli işlenmesini sağlamak için kortikal devreleri düzelteren bir mekanizma olarak varsayılmaktadır (Andersen, 2003).

Gelişmekte olan insan beynindeki sinaptik oluşumunun araştırıldığı ilk çalışmalar, sinaps yoğunluğunun yaş ve beyin bölgesine göre değiştiğini ortaya koymuştur. Sinapsların artışı gebeliğin 20. haftasında başlarken, yoğunluğu, postnatal dönemde özellikle ilk aylarda hızla artarak, 2 yaşında yetişkindeki seviyenin yaklaşık %50'inden daha yüksek bir düzeye ulaşır (Peter, 1979) (Şekil 1). Kemirgenlerde, kritik sinaptogenez dönemi, postnatal ilk üç haftada gelişir ve 2. haftada zirveye ulaşır. Postnatal 4. günde sıçan dentat girusunun moleküler tabakasında, yetişkin seviyelerinin %1'den az olan sinaps sayısı, P25'e erişkin seviyesi ulaşır (Crain, Cotman, Taylor, & Lynch, 1973)

Miyelinizasyon, belirli beyin bölgelerinde çocukluk ve ergenlik dönemine kadar devam eden uzun süreli bir süreç olup (Şekil 1), memeli beyinde nörotransmisyonun yayılması ve hızı için gereklidir. Miyelin sentezinden sorumlu olan oligodendrositlerin gelişimi, insanlarda intrauterin dönemde başlar. Gestasyonun 18-28. haftaları arasında baskın hücre tipi olan pre-oligodendrositler (Pre-OL: miyelinleştirmeyen, mitotik olarak aktif) oligodendrosit öncüleri olarak tanımlanır, 28-40 haftalar arasında en çok gözlenen 'olgunlaşmamış OL'lere (mitoz sonrası, miyelinleştirici) dönüşürler. (Craig ve ark., 2003). Prematüre bebeklerde veya miadında doğan bebeklerde olgunlaşmamış periventriküler beyaz cevherin yaralanması, serebral palsinin en yaygın nedenidir (Volpe, 2003). Beyaz cevher prematüre bebekte gri cevherden daha hassastır ve en hassas dönem 23.-32. gebelik haftaları arasındadır. Beyaz cevher aynı zamanda term bebeklerde, daha büyük bebeklerde ve çocuklarda da yaralanmaya karşı hassas olup yaralanmanın topografisi ve patogenezi, prematürite ile ilişkili periventriküler beyaz cevher hasarından farklıdır (Cowan ve ark., 2003). Kemirgen MSS'de, P1-P3'teki beyaz cevher gelişimi ve aksonal büyüme, insanda 23-32 gebelik haftalarına karşılık gelir, P7'de ise 32-36 haftaya benzerdir (Craig ve ark., 2003). Bu nedenle P7 kemirgen, erken doğmuş bir bebeği temsil ederken, P10'daki kemirgenlerin, en azından beyaz cevher gelişimi açısından zamanında doğmuş bir bebekle karşılaştırılabilir olduğunu düşünmektedir (Hagberg, Ichord, Palmer, Yager, & Vannucci, 2002). Kemirgenlerde P10-P14'te devam etmekte olan miyelinizasyon, olgun OL belirteçlerinin (miyelin bazik protein gibi) saptanabilir olduğu yaklaşık P20'de zirveye ulaşır.

Beyinde miyelinizasyon genellikle aşağıdan yukarıya ve arkadan öne doğru ilerler; oksipital lobda başlar, bunu temporal ve frontal loblar takip eder (Tasker, 2006;

Volpe, 2000). İnsan beyni olgunlaştıkça, artan miyelinizasyona beyin su içeriğinde bir azalma eşlik eder. Bu, insanlarda 28 haftalık gebelikte özellikle belirgindir; bu süre, pre-OL'lerden olgunlaşmamış OL'lere geçişe karşılık gelir. Hem sıçanlarda hem de farelerde, kemirgenlerde bilinen miyelinizasyon zamanlaması ile tutarlı olarak, korpus kallozumda ve ayrıca iç ve dış kapsüllerde lif olgunlaşmasının en az P30-P40'a kadar devam ettiğini göstermiştir (Bockhorst ve ark., 2008). Genç sıçanlarda yaralanmalarda, P1'de, P5'den daha fazla korpus kallosum kaybı ve daha ağır nörodavranışsal bozukluklarla sonuçlanır (Threlkeld, Rosen, & Fitch, 2007).

MSS'nin yerleşik immüno-kompetan hücreleri olan mikroglia, fare beynini embriyonik 9,5. gün civarında, sıçan beyninde ise biraz sonra kolonize etmeye başlar. Doğumdan sonra 0-11 günler arasında mikroglial hücre sayılarında 20 kat artış meydana gelir. Hücreler tipik olarak tam olarak farklılaştıkça daha dallı hale gelir ve P30'a kadar sıçan beyninde olgun bir dinlenme fenotipi sergiler (Alliot, Godin, & Pessac, 1999).

Kan beyin bariyerinin hem kemirgenlerde hem de insanlarda embriyogenez sırasında kurulduğu, işlevsel olduğu ve perisit endotel hücre etkileşimleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği bilinmektedir (Daneman, Zhou, Kebede, & Barres, 2010; Saunders, Lidelow, & Dziegielewska, 2012). Serebral damarlardaki ve koroid pleksustaki sıkı bağlantılar, embriyonik gelişimin çok erken dönemlerinde, endotelial hücreler farklılaşmaya başlar başlamaz mevcuttur ve doğumda yeterince oluşmuştur (Engelhardt, 2003). Bununla birlikte, sıçan korteksindeki kapillerler, P14-P21'ye kadar yetişkin benzeri bir görünüm (astroitik son ayaklarla ilişkili damarlar) sergilemez (Cornford, & Cornford, 1986; Xu & Ling, 1994).

## **2.2. Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarı Deneysel Modelleri**

İnsanlarda hızlı beyin büyümesi periyodu, gebeliğin son üç ayında başlar ve iki yaşına kadar devam eder. Bu dönem, yenidoğan kemirgenlerde postnatal 2-10. günlere (P2-P10) karşılık gelmektedir (Semple ve ark., 2013). Bu dönem, aynı zamanda beyin hasarlayıcı uyarılara karşı en savunmasız olduğu dönem olması nedeniyle gelişen beyinde hasarlanma mekanizmalarının araştırılmasında kullanılmaktadır. İskemik, travmatik ve hiperoksik beyin hasarının kemirgen modelleri, gerek oluşan hasarın altında yatan mekanizmaları araştırmak gerekse potansiyel terapötik yaklaşımları

değerlendirmek için araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Beyin hasarına sebep olan etken ne olursa olsun, yaralanmalar birçok ortak patolojik mekanizmayı paylaşırlar (Kochanek, 1993). Ayrıca, gelişmekte olan beynin yetişkin beynine kıyasla yaralanmaya farklı yanıt verdiği de bilinmektedir (Babikian ve ark., 2011; Claus ve ark., 2010; Ikonidou, & Kaindl, 2011). Bu nedenle, immatüre beyin hasarı modellemelerinde değişen yaşlardaki farklı hayvanlar kullanılmaktadır (Cansev ve ark., 2013; Claus ve ark., 2010; Felderhoff-Mueser ve ark., 2005; Goren ve ark., 2017; Ikonidou, & Kaindl, 2011; Jungner ve ark., 2019).

Deneyisel modellerde hiperoksik beyin hasarı oluşturmak için %80-85'lik oksijen konsantrasyonu ile 6-48 saatlik maruziyet süresi kullanılmaktadır (Jungner ve ark., 2019; Sifringer ve ark., 2012). 2005 yılında hiperoksi ile indüklenmiş gelişimsel beyin hasarı hayvan modeli 6 günlük Wistar sıçan yavrularına 2-48 saat süreyle yüksek oranda oksijen verilerek oluşturulmuştur (Felderhoff-Mueser ve ark., 2005).

Ayrıca, beyin hasarını değerlendirmek için kısa süreli hiperoksiye sıklıkla P3 - P6 arasında başlanır (Jungner ve ark., 2019; Murray ve ark., 2020). Literatürde, uzun süreli oksijen maruziyetinden sonra beyin hasarının incelendiği çalışmalarda bulunmaktadır (Ali ve ark., 2021; Dapaah-Siakwan ve ark., 2019; Goren ve ark., 2017).

Hiperoksi sonucu oluşan biyokimyasal, moleküler ve hücrel değişiklikler farklı mekanizmalara dayandırılmaktadır: Hücre ölümü ve otofaji, nörotrofinler ve nörotransmitterler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve ROS-bağımlı sistemler ve enflamasyon (Brehmer ve ark., 2012; Reich ve ark., 2017; Sifringer ve ark., 2009, 2010). Bu mekanizmaların anlaşılması, hiperoksiyle sekonder gelişen hasarın ve uzun vadeli sekellerin tanımlanması ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

### **2.2.1 Hiperoksi ve Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, hücrelerdeki zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi sonucu ortaya çıkan bir durumdur. Fizyolojik koşullar altında, ROS fazlalığı, sıkı bir şekilde düzenlenmiş antioksidatif enzimler ve radikal süpürücüler sistemi tarafından dengelenir. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stress sonucunda oksidatif hasar meydana gelmektedir (Davies, 2001). ROS'un hücre

canlılığı, proliferasyon, farklılaşma, yaşlanma, apoptoz ve diğer çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri etkilediği gösterilmiştir (Giorgio, Trinei, Migliaccio, & Pelicci, 2007). Oksidatif stres hem gelişen akciğerde hem de beyinde hiperoksinin neden olduğu hasara katkıda bulunan ana faktörlerden biridir (Obst ve ark., 2022). Yenidoğan beyni serbest demir ve çoklu doymamış yağ asitleri yönünden zengin, buna karşın antioksidan enzim düzeyleri ve non-enzimatik antioksidanlar açısından diğer dokulara göre fakirdir (Zaghloul ve ark., 2012). Ayrıca, nöronlar oksijen bağımlı mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla enerjilerini sağlarlar, dolayısıyla diğer dokulardan daha fazla oksidatif risk taşırlar (Ikonomidou & Kaindl, 2011). Bu nedenlerden dolayı preterm bebekler süperoksit, hidrojen radikalleri ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi ROS üretiminin artmasıyla karakterize oksidatif strese karşı çok hassastır. Hiperoksik koşullar altında artan ROS, DNA hasarını, protein ve lipid oksidasyonunu tetikleyerek, belirli hücre tiplerinin ve gelişen organların fizyolojik özelliklerinin ve işlevinin değişmesine, kan-beyin bariyerinin bozulmasına, enflamasyona, sitotoksik ve vazojenik ödem oluşumuna neden olmaktadır (Shim & Kim, 2013; Ji, Sang & Seung, 2005; Deuber & Terhaar, 2011). Lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi çeşitli makromoleküller üzerinde koruyucu etkisi olduğu bilinen hem intrasellüler hem de ekstrasellüler sıvıda bulunan doğal antioksidan sistemleri, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ve bazı proteinlerden oluşur. Sitoplazmada (SOD1), mitokondride (SOD2) bulunan ve ekstrasellüler alana salgılanan (SOD3) SOD'lar, süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ )'i serbest oksijen radikalinden daha az reaktif olan  $H_2O_2$ 'ye dönüştürür (Zaghloul ve ark., 2012). Hiperoksi yenidoğan sıçanlarda, beyinde SOD1 ve SOD3'ün azalmasına neden olur (Endesfelder ve ark., 2017a).

Çoğunluğu besin kaynaklı olan non-enzimatik antioksidan sistem, vitamin C, vitamin E, vitamin A, glutatyon gibi molekülleri içermektedir (Holmström & Finkel, 2014).

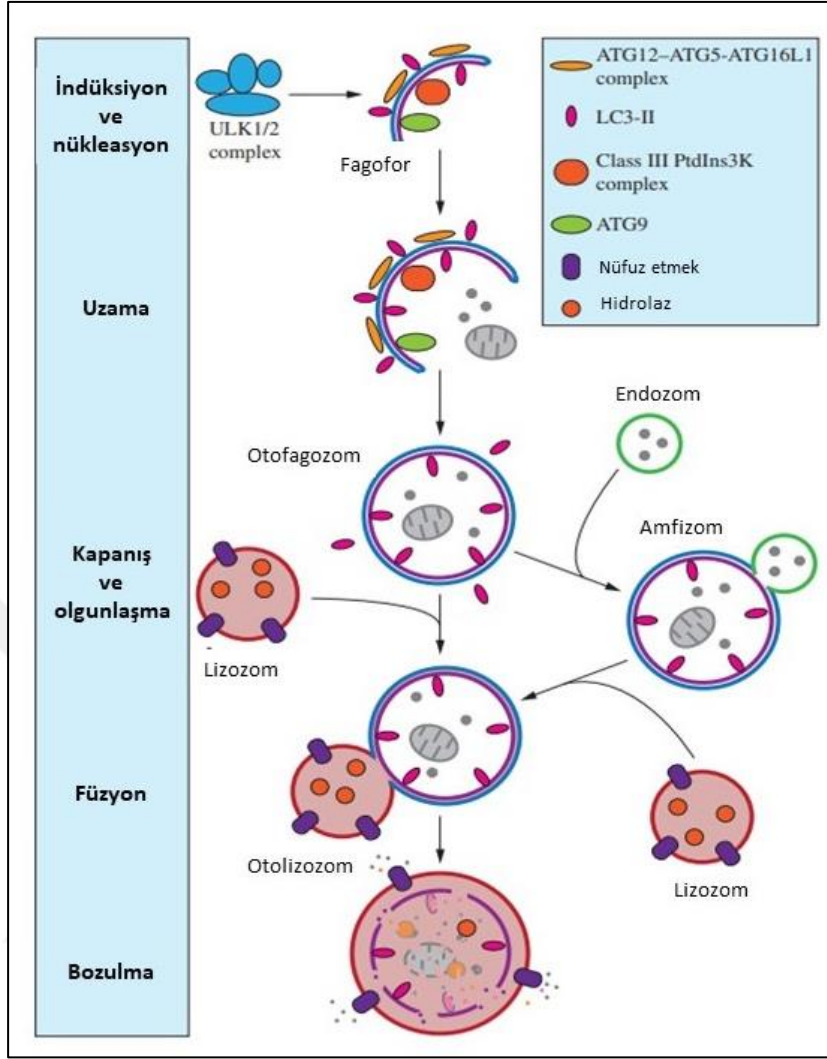
### **2.2.2. Hiperoksi ve Otofaji**

"Kendi kendini yeme" anlamına gelen otofaji, sağlıklı ve hastalıklı dokuda sitoplazmik bileşenlerin devir (turnover) ile geri dönüşümünü kapsayan hücrenin

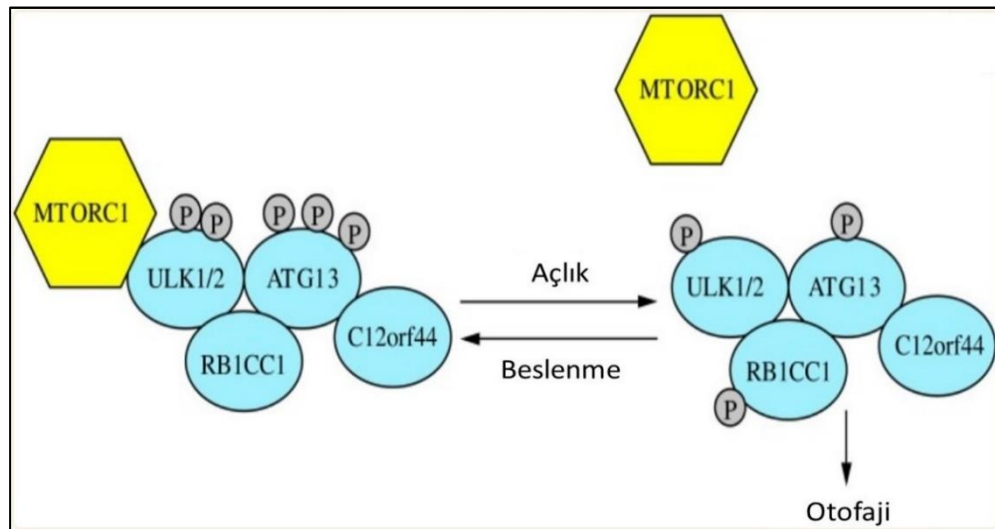
kendini parçaladığı bir süreçtir. Otofaji, proteinlerin parçalanması ve organel dönüşümü gibi homeostatik fonksiyonları sürdüren katabolik bir süreç olmasının yanı sıra hücrel strese yanıt olarak hayatta kalma mekanizmasıdır. Bu süreçte, bazı hücre içi yapılar (mitokondri, ER organeller ya da sitoplazmanın bir kısmı gibi), otofagozom olarak adlandırılan çift membranlı veziküller içine alınır, takiben bu veziküller lizozomlarla birleşir ve lizozomal enzimler tarafından parçalanır (Gozuacik, & Kimchi, 2007; Mizushima, Levine, Cuervo, & Klionsky, 2008).

Otofaji, hem zarar görmüş organelleri, uzun ömürlü proteinleri ve protein agregatlarını uzaklaştırmak için hem de besin ve büyüme faktörü eksikliği, patojen enfeksiyonları, hipoksi veya ROS gibi hücrel stres durumlarında aktive olur (Anding, & Baehrecke, 2015). Hücre, yaşamak için gerekli besinleri bulamadığı durumlarda kendi içyapısını parçalayarak varlığını sürdürmeye çalışır. Bu özellik, hücrenin zor koşullara uyum sağlamasına yardımcı olurken, aynı zamanda yaşamsal organları tüketerek hücre ölümüne de neden olabilir (Galluzzi ve ark., 2011).

Otofajinin beş aşaması vardır: 1-İndüksiyon ve nükleasyon, 2-Genişleme, 3-Kapanma ve olgunlaşma, 4-Yapışma-füzyon, 5-Degradasyon (Şekil 2). Vezikül oluşumu, vezikül genişlemesi ve otofagozom oluşumu, otofagozomların lizozomlarla füzyonu ve degradasyonunun gerçekleştiği bu aşamalarda ATG (autophagy-related genes) gen ailesi tarafından kodlanan çok sayıda protein (Beklin-1, ATG2, ATG3, ATG4, ATG5, ATG6, ATG7, ATG8, ATG9, ATG10, ATG12, ATG16 ve ATG18 gibi) önemli roller üstlenir (Hansen ve ark., 2007; Hars ve ark., 2006; Meléndez & Levine, 2009). Fosfatidilinositol 3-kinazlar (Tip I PI3K-AKT-mTOR ve tip III PI3K-VPS34/Beklin 1), otofajik vezikül oluşumunun temel sinyal molekülleri olup otofaji sürecinin kontrolünde önemli bir rol oynarlar (Anding & Baehrecke, 2015; Xie & Klionsky, 2007). Besinden zengin koşullarda, MTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1), ULK1/2, ATG13, RB1CC1 ve C12orf44 proteinlerinden oluşan bir kompleks ile birleşir ve fosforilasyon yoluyla bu kompleksi inaktive eder. Besin azlığı durumu ise MTORC1 kompleksten ayrılır. Serbest kalan ve kısmen defosforile edilen ULK1/2- ATG13-RB1CC1- C12orf44 kompleksi otofajiyi indükler (Parzych & Klionsky, 2014; Juhász ve ark., 2008) (Şekil 3).

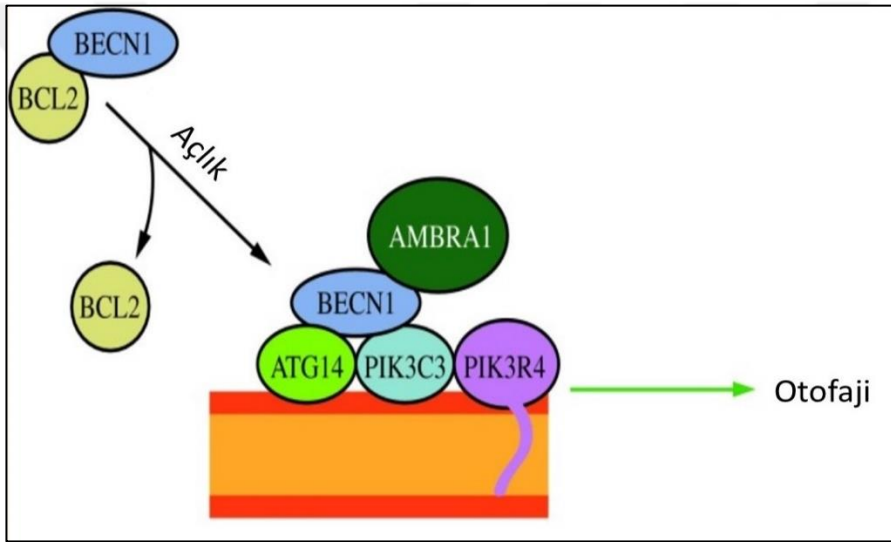


Şekil 2. Makrotofajinin aşamaları (Parzych, & Klionsky, 2014).



Şekil 3. ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleksi ile otofajinin aktivasyonu (Parzych, & Klionsky, 2014).

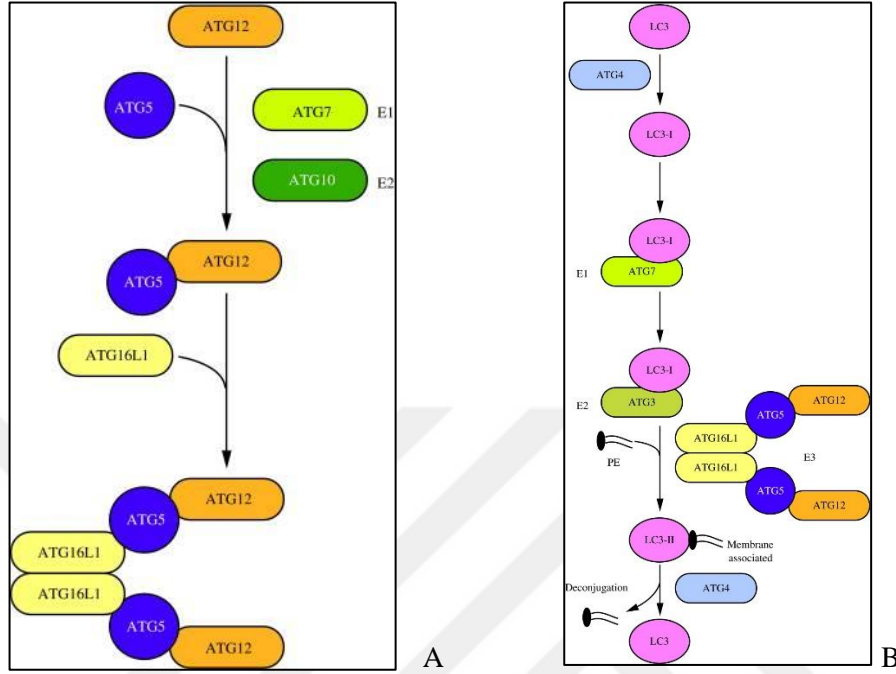
Otofagozom oluşumu için gereken bir diğer kompleks, ATG14 içeren tip III fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) kompleksidir. Bu kompleks, otofagozomun nükleasyon aşamasında işlev görür. Bu kompleksin yapısında PIK3C3, PIK3R4 ve BECN1 bulunur ve makrotofaji için gerekli olan BECN1 ile etkileşime giren proteinler aracılığıyla regüle edilir. Bu proteinlerden biri olan anti-apoptotik BCL2, BECN1'i bağlayarak PIK3C3 ile etkileşimine engel olur ve böylece makrotofajiyi inhibe eder. BECN1 bağlayan diğer bir protein olan KIAA0226/Rubicon da PIK3C3 aktivitesini inhibe eder. Ayrıca, AMBRA1 ve SH3GLB1/Bif-1, PtdIns3K kompleksinin regülatörü olarak BECL-1'e bağlanır (Itakura, Kishi, Inoue & Mizushima, 2008; Maria Fimia ve ark., 2007; Takahashi ve ark., 2007) (Şekil 4).



Şekil 4. Tip III PtdIns3K kompleksinin aktivitesi (Parzych, & Klionsky, 2014).

Memelilerde oluşmaya başlayan otofagozomun genişlemesini sağlayan ubiquitin benzeri proteinler içeren iki konjugasyon sistemi vardır. İlk sistemde, ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksi oluşur (Şekil 5A). İkinci sistemde, dört ATG4 izoformu ve birkaç Atg8 benzeri protein bulunur (Weidberg ve ark., 2010). Otofagozomlarla lokalize bu iki alt ailenin, otofagozom uzaması ve tamamlanmasında farklı adımlarda görev yaptıkları düşünülmektedir (Kabeya ve ark., 2004; Weidberg ve ark., 2010). LC3, memelilerde Atg8 benzeri proteinler arasında en iyi karakterize edinidir. LC3'ün ATG4 ile işlenmiş formuna LC3-I, PE konjuge formuna LC3-II adı verilir (Kabeya ve ark., 2004). Memelilerde, LC3-I'in (konjuge olmayan form) LC3-

II'ye (lipidize form) dönüşümü, otofagosom oluşumunun bir göstergesi olarak kabul edilir (Kabeya ve ark., 2000) (Şekil 5B).



**Şekil 5.** Konjugasyon sistemleri. A. ATG12-ATG5-ATG16L1 konjugasyon kompleksi; B. LC3 konjugasyon sistemi (Parzych & Klionsky, 2014).

Otofaji, kargo içeren olgun otofagosomun lizozom ile füzyonuyla sonuçlanır. Füzyon sırasında otofagosomal membranda kalan LC3B, ya lizozomal aktivite tarafından parçalanır ya da Atg4B tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile dış membran yüzeyinde LC3B-I'ye dönüştürülür. Otofagosom olgunlaşması ve füzyonu, Rab7 gibi küçük GTPaz proteinler, sınıf C Vps proteinleri, UVRAG ve lizozomla ilişkili membran proteinleri (LAMP2) gibi birkaç bilinen faktöre bağlı olduğu düşünülmektedir (Gutierrez, Munafo, Beron, & Colombo, 2004; Jäger ve ark., 2004; Liang ve ark., 2008).

Otofajik kargonun otofagosoma hedeflenen teslimi, seçici otofaji adaptörleri olarak tanımlanan birkaç proteine bağlıdır. Bu proteinler, özelleşmiş bir LC3-etkileşen bölge (LIR) aracılığıyla LC3 (veya Atg8 homologları) ile etkileşime geçebilir (Johansen, & Lamark, 2011).

Otofajiyi indükleyen çeşitli mekanizmalar keşfedilmiştir; oksidatif stresin, hasar gören hücre materyali parçalamak ve geri dönüştürmek için aktif bir yanıt olarak otofajiyi tetiklediği ve otofajik hücre ölümü belirteçlerinin seviyelerinin

değişmesine yol açtığı bildirilmiştir (Sifringer ve ark., 2012). Hiperoksi, sitozolik ve mitokondriyal kaynaklardan ROS üretimini artırarak oksidatif strese neden olur (Parinandi ve ark., 2003; Ryter, & Choi, 2013). Farelerde akciğer hasarına neden olan >%95 O<sub>2</sub> uzamış hiperoksi, morfolojik ve biyokimyasal otofaji belirteçlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Tanaka ve ark., 2012). İn vitro olarak, hiperoksi maruziyeti, kültüre edilmiş epitel hücrelerinde (Beas-2B ve insan bronşiyal epitel hücreleri) LC3B-I'in ekspresyonunu ve LC3B-II'ye dönüşümünü indüklediği ayrıca, otofagosom oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2012). Aynı çalışmada, LC3B'nin siRNA ile baskılanmasının epitel hücrelerinde hiperoksiye bağlı hücre ölümünü artırması, LC3B'nin artmış ekspresyonunun hiperoksiden sonra sitoproteksiyon sağladığını düşündürmektedir (Tanaka ve ark., 2012). Ayrıca, hiperoksi tarafından LC3B'nin aktivasyonunun ROS'a bağlı olduğu, genel antioksidan N-asetil-L-sistein ve mito-TEMPO gibi mitokondri hedefli bir antioksidan ile inhibe edildiği belirlendi (Tanaka ve ark., 2012).

LC3B'nin, hiperoksiye bağlı epitel hücre apoptozunda da işlevsel bir rol oynadığı gösterilmiştir. LC3B'nin transkripsiyonel olarak düzenlenmesi, ekztrinsik apoptotik yolların belirleyici düzenleyicisi olan ölüm indüktif sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu ve epitel hücrelerinde hiperoksiye bağlı hücre ölümünü uyarmaktadır. Öte yandan, LC3B'nin aktivasyonu, DISC oluşumunu, kaspaz-3'ün kırılmasını ve apoptozun başlatılmasını inhibe ederek hiperoksiden sonra sitoproteksiyon sağlamaktadır. Bu deneyler, LC3B'nin oksijene bağlı sitotoksistede kritik bir pro-yaşam faktörü olarak hareket ettiğini düşündürmektedir (Tanaka ve ark., 2012).

Hiperoksi ile indüklenen epitel hücre ölümüne katkıda bulunan Fas bağımlı apoptoz yollarının regülasyonunda LC3B'nin potansiyel rollerini ortaya çıkarmıştır (Ryter, & Choi, 2013). Şöyleki, LC3B ve Fas arasında etkileşim açıklanmıştır. Kısa süreli hiperoksi bu etkileşimi indüklerken, uzamış hiperoksi ile kompleksin ayrıldığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar, hiperoksiye bağlı LC3B aktivasyonunun, kompleks oluşumu aracılığıyla Fas apoptotik yollarını inhibe ederek akciğer epitel hücrelerinde sitoproteksiyon sağladığını ortaya koymaktadır. Bu deneyler, otofaji ve apoptozu düzenleyen mekanizmaların bazı örtüşen özellikleri paylaşabileceğini göstermektedir (Ryter, & Choi, 2013). Diğer bir çalışmada ise hiperoksinin immatür

sıçan beyinlerinde anahtar otofaji protein (Beklin-1, Atg3, 5, 12, LC3A-II ve LC3B-II) seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Bendix ve ark., 2012).

### 2.2.3. Hiperoksi ve Nörotrofinler

Nörotrofinler, sinir hücrelerinin büyümesini, gelişimini, diferansiyasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyen protein ve peptitlerdir. Bu maddeler, sinir sisteminin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için kritik öneme sahiptir. Nörotrofinler, özellikle sinir hücrelerinin sağlığını koruma, hasar görmüş hücreleri onarma ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi düzenleme gibi görevlerinin yanısıra nöroplastisiteyi destekleyerek, sinir sisteminin deneyim ve öğrenmeye uyum sağlamasına yardımcı olurlar. Aynı zamanda sinir hücrelerini hasara karşı koruyabilir ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde rol oynarlar (Bibel & Barde, 2000). Ayrıca geri çekilmeleri nöron ölümüne yol açabilir (Huang & Reichardt, 2001).

Nörotrofinlerin özellikle iki üyesi, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF, brain-derived nerve growth factor) ve glial kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF, glial-derived nerve growth factor), MSS'de yaygın bir dağılım gösterir. BDNF, özellikle MSS, yani beyin ve omurilikte bulunan bir nörotrofindir. Sinir hücrelerinin gelişimini ve plastisitesini destekler. GDNF, özellikle dopaminerjik nöronlar gibi belirli nöron tipleri üzerinde koruyucu etkilere sahiptir.

BDNF ekspresyonunun, sağlıklı bireylerde doğum öncesi düşük, doğum sonrası yüksek seviyelerde başladığı ve erişkinlikte zamanla azaldığı ortaya konulmuştur (Maisonpierre ve ark., 1990). Stres faktörlerinin beyinde BDNF ekspresyonunu azalttığı (D'Sa & Duman, 2002; Smith ve ark., 1995) ve BDNF sentezindeki düşüş veya bozukluğun, nörolojik hastalıklara yatkınlığı artırabildiği bilinmektedir (Karege ve ark., 2002),

Hiperoksiye maruz bırakılmış P6 yenidoğan sıçanlarda nörotrofinlerin ve ilgili sinyal yollarındaki proteinlerin, örneğin ERK (extracellular signal-regulated kinase), ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2004; Sifringer ve ark., 2010). Postnatal 7. günden itibaren 5 gün süreyle hiperoksik koşullara maruz bırakılan yenidoğan fare yavrularında BDNF ve GDNF ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Sengoku, Murray, & Wilson, 2016).

#### 2.2.4. Hiperoksi ve Nöroenflamasyon

Nöroenflamasyon, sinir dokusunun enflamasyonu olarak tanımlanır. Bu süreç, genellikle beyin ve omurilikte bulunan bağışıklık sistemi hücreleri olan mikroglia aktivasyonu ile tetiklenir. Normalde, bu hücreler sinir sistemindeki zararlı maddelere tepki vererek koruyucu bir rol oynarlar. Ancak, travma, enfeksiyon, nörodejeneratif hastalıklar veya oksidatif stres gibi durumlar, mikrogliaların aşırı aktivasyona yol açabilir. Aktive olmuş mikroglia, enflamatuar moleküllerin (örneğin sitokinler, kemokinler ve reaktif oksijen türleri) salınımına neden olur. Bu inflamatuvar yanıt, beyin dokusunda hücre hasarına, sinir hücrelerinin ölümüne ve nörolojik bozukluklara katkıda bulunabilir (Zusso ve ark., 2020).

Sitokinler, bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan ve inflamatuvar yanıtta katılan hücreler arasında iletişimi düzenleyen peptit veya glikoprotein yapısında moleküllerdir. Bu moleküller, bağışıklık hücreleri arasında sinyal iletimini sağlayarak inflamatuvar yanıtı düzenler ve koordine ederler. Çeşitli uyarıcılara yanıt olarak salgılanan sitokinler, özellikle bağışıklık hücreleri tarafından üretilir ve çeşitli hücreler üzerinde etki gösterir (O'Reilly ve ark., 1995).

Bağışıklık sistemi, doğuştan (innate) ve adaptif (özellik) olmak üzere iki ana bölüme ayrılır ve her iki sistemde de farklı sitokinler görev alır. Doğuştan bağışıklık sistemi, organizmanın doğuştan gelen savunma mekanizmalarını içerir ve hızlı, genel bir tepki sağlar. Bu sistemde rol oynayan bazı sitokinler şunlardır: IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha), IFN- $\alpha$  (interferon-alpha). Adaptif bağışıklık sistemi ise önceki enfeksiyonlara veya aşılarla karşı öğrenilen spesifik (özellik) bir yanıt sağlar. Bu sistemin sitokinleri arasında şunlar bulunur: IL-2 (interleukin-2), IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), IL-4 (interleukin-4), IL-10 (interleukin-10). Sitokinler, genel olarak pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar olarak sınıflandırılabilir. Pro-inflamatuar sitokinler, iltihaplanma sürecini artırarak enfeksiyonla mücadelede ve yara iyileşmesinde rol oynarlar. Bu kategoriye giren sitokinler şunlardır: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . Anti-inflamatuar sitokinler ise inflamatuvar aktiviteyi azaltarak veya dengeleyerek bağışıklık sisteminin kontrolünü sağlarlar. Bu kategoriye giren sitokinler şunlardır: IL-4, IL-10, IL-12, IL-13. IL-8 gibi

bazı sitokinler ise hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar özelliklere sahip olabilir, bu nedenle bağışıklık sistemi düzenlenmesinde karmaşık bir rol oynarlar (Dinan & Dinan, 2009; Raison ve ark., 2009) .

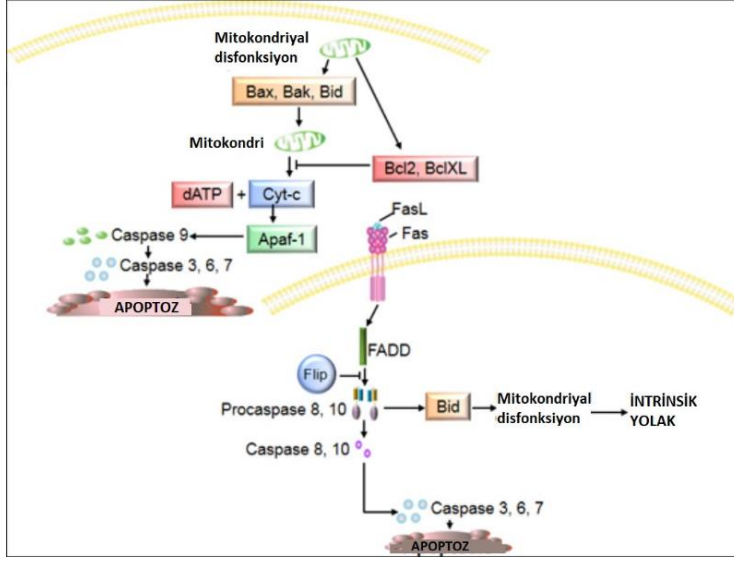
Hiperoksi, kaspaz-1 mRNA ve protein düzeyleri ile TNF-alfa, IL-1 $\beta$ , IL-18 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin ve IL-18 reseptör düzeylerinin belirgin şekilde yükselmesine neden olarak gelişmekte olan beyinde enflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (Endesfelder ve ark., 2017b; Felderhoff-Mueser ve ark., 2005; Sifringer ve ark., 2009). Oluşan bu enflamatuvar yanıt, hiperoksinin neden olduğu hücre ölümüyle ilişkilidir (Dapaah-Siakwan ve ark., 2019; Felderhoff-Mueser ve ark., 2005). Nitekim, intraperitoneal verilen spesifik bağlayıcı bir protein ile IL-18'in inhibisyonu sonucu immatür fare ve sıçan beyinlerinde hücre ölümünün azaldığı gösterilmiştir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2005). Hiperoksi sonucu oluşan bu enflamatuvar tepkiler aynı zamanda beyinde bağışıklık hücreleri olan mikrogliaların aktivasyonu ve modülasyonunu da uyarır (Obst ve ark., 2022). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, hiperoksiye bağlı enflamatuvar yanıtların bastırılmasının, apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve oligodendroglial öncü hücrelerin proliferasyonunu ve olgunlaşması iyileştirdiği gösterilmiştir (Schmitz ve ark., 2014).

### **2.2.5. Hiperoksi ve Apoptoz**

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, hücrelerin kontrollü bir şekilde ölmesi sürecini ifade eder. Bu süreç, bir organizmanın normal gelişimi, doku homeostazı ve bağışıklık sistemi tarafından düzenlenir. Apoptoz, hücrenin kendini programlamış bir şekilde ölmesini sağlar, bu da vücutta istenmeyen, hasar görmüş, ya da gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar.

Kelime olarak "apoptoz", Yunanca kökenli olan "apo" (ayrı) ve "ptosis" (düşme) kelimelerinden türetilmiştir, ve bu terim, 1972 yılında Avustralyalı patolog J.F.R. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz, hücrelerin morfolojik değişikliklerden geçerek kendiliğinden parçalanmasını içeren bir süreçtir ve bu parçalanma, çevre dokulara minimal etki bırakacak şekilde gerçekleşir. Apoptoz, hücre ölümü sürecinin programlı ve düzenli bir şekilde gerçekleşmesini sağlar, bu da hücrelerin kontrolsüz büyümesini önler ve organizmanın sağlığını sürdürmesine yardımcı olur (Dağdeviren, 2021).

Apoptoz iki ana alternatif yolla indüklenir: ölüm reseptörü aracılı (veya ekstrinsik) ve mitokondri bağımlı (veya intrinsik), her ikisi de yürütücü kaspazların aktivasyonuna yol açar (Huppertz ve ark., 1999). Kaspazlar, temel hücre proteinleri yok ederek kontrollü hücre ölümüne yol açan bir grup hücre içi sistein proteaz enzimidir. İki tip kaspaz enzimi vardır: apoptoz-sinyal yolları aracılığıyla aktive olan başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), genişleyen bir kaskadda apoptozu gerçekleştiren efektör kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive eder (Musumeci, ve ark., 2015). Kaspaz 3, birçok dokuda DNA parçalanması ve hücre ölümü dahil tipik apoptoz özelliklerini teşvik eder. Apoptozun intrinsik yolu mitokondriyal parametreler tarafından düzenlenir (Chabi ve ark., 2008). Mitokondriyal aracılı apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle pro-apoptotik proteinlerin sitozole salınması yoluyla başlayabilir (Chabi ve ark., 2008; Fulda & Debatin, 2004; Ganguly & Pierce, 2015). Bununla birlikte, mitokondri aynı zamanda anti-apoptotik proteinler de içerir (Chabi ve ark., 2008). Mitokondriyal pro- ve anti-apoptotik proteinler B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ailesine aittir ve aralarındaki denge apoptozu kontrol eder (Akl ve ark., 2014; Fulda & Debatin, 2004). Anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-XL sitokrom c (cyt-c) salınımını inhibe ederken, hepsi pro-apoptotik proteinler olan Bcl-2-ilişkili X proteini (Bax), Bcl-2 homolog antagonisti/katili (Bak) ve BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti (Bid) mitokondriden salınımını teşvik eder. Cyt-c ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) apoptotik proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanarak prokaspaz 9'u toplayan ve aktive eden multimerik bir kompleks oluşturur, bu da kaspaz 3'ü aktive ederek hücre apoptozuna neden olur (Şekil 6) (Loreto ve ark., 2007). Apoptozun ekstrinsik yolu, hücre yüzeyindeki pro-apoptotik reseptörler tarafından aktive edilir (Ghobrial, Widzig, & Adjei, 2005).



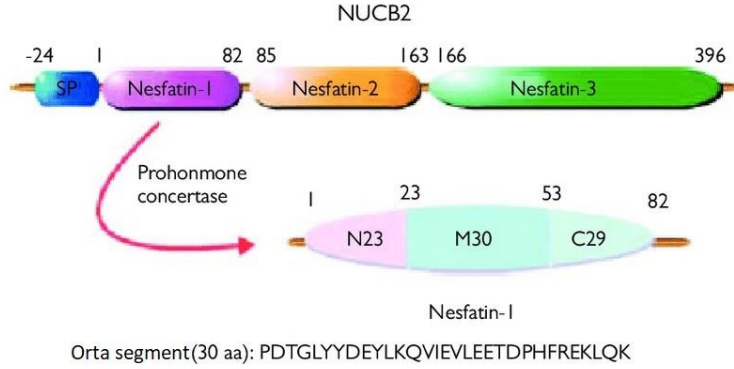
**Şekil 6.** Apoptozun intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik yolağı. Bcl-2: B-hücreli lenfoma-2; Bcl-XL: B-hücreli lenfoma-XL; Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini; Bak: Bcl-2 antagonist katili; Bid: BH3 etkileşimini alan ölüm antagonist reseptörü; dATP: deoksiadenosin trifosfat; Apaf-1: apoptotik proteaz aktive eden faktör; FasL: ölüme neden olan molekül Fas ligandı; FADD: Fas ile ilişkili ölüm alanı; Flip: FLICE inhibitör proteini

Doğumdan sonraki ilk 5 günde yüksek dozda oksijene maruz bırakılan immatür sıçanlarda apoptotik hücrelerin, aynı dönemde gözlenen fizyolojik apoptoza göre arttığı ve korteks, bazal ganglionlar, hipotalamus, striatum, hipokampus ve beyaz cevherin etkilendiği ve beyin ağırlığında bir azalma olduğu bildirilmiştir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2004, 2005; Yiş ve ark., 2008). 6. günden itibaren 2-72 saat süreyle %80 oksijene maruz kalan yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmalar, hiperoksinin Fas ve Fas ile ilişkili sinyal yollarını indükleyerek reseptör aracılı apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (Dzietko ve ark., 2008; Sifringer ve ark., 2012). Uzun süreli hiperoksinin de yenidoğan sıçan yavrularında nöronal apoptozu tetiklediği, beyaz cevheri etkilediği, hipokampus ve kortekste nöronal sağ kalımı azalttığı belirlenmiştir (Goren ve ark., 2017).

### 2.3. Nesfatin

2006 yılında Oh-I ve meslektaşları, hipotalamusta üretilen ve nesfatin-1 olarak da bilinen yeni bir anoreksijenik adipokin olan nesfatin'i tanımlamıştır. Nesfatin-1, *nükleobindin2* (NUCB2)'nin N-terminusunda bulunur ve canlılarda doygunluğun indüksiyonunda vazgeçilmez bir role sahiptir (Oh-I ve ark., 2006). (NUCB2)

nükleobindin-2, prohormon dönüştürücüler aracılığıyla nesfatin-1 (1-82 amino asitler), nesfatin-2 (85-163 amino asitler) ve nesfatin-3 (166-396 amino asitler) olarak bölünür. Nesfatin-1 molekülü üç bölümden oluşur: N-terminali (N23), orta kısım (M30) ve C-terminali (C29). M30, bu peptitin fizyolojik etkilerinin indüklenmesinde ve özellikle iştahı azaltmada etkili bir rol oynar (Şekil 7) (Tekin, Cicek, & Konyaligil, 2019).



**Şekil 7.** NUCB2 proteininin yapısı ve Nesfatin-1 oluşumu (Tekin ve ark., 2019).

Nesfatin-1, hem MSS hem de periferik bölgelerde geniş bir dağılıma sahiptir (Goebel-Stengel, & Wang, 2013). MSS'de nesfatin-1 eksprese eden nöronların hipotalamik paraventricüler çekirdek, supraoptik çekirdek, arkuat çekirdek, lateral hipotalamik alan gibi hipotalamik çekirdeklerin yanısıra beyin sapında nükleus soliter traktusta da lokalize olduğu gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Ayrıca, nesfatin-1'in, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kan beyin bariyerini iki yönlü (hem kan-beyin hem de beyin-kan) geçebildiği gösterilmiştir (Price, Samson, Niehoff, & Banks, 2007). Nesfatin-1, enjeksiyondan sonraki ilk 20 dakika içinde kan içinde nispeten istikrarlı bir durumda kalır ve kan beyin bariyerini basit difüzyonla aşabilir. Bu durumda, sistemik toksisite riski olmadığı varsayılırsa, nesfatin-1'in periferik yoldan yüksek dozlarda verilebileceği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, nesfatin-1'in periferik yoldan uygulanmasının, sistemik toksisite riski açısından kabul edilebilir olduğunu düşündürmektedir (Pan ve ark., 2007).

Varsayılan NUCB2/nesfatin-1 reseptörü henüz tanımlanmamış olsa da, nesfatin-1 için spesifik bağlanma bölgeleri hem MSS'de (örn. hipotalamus, korteks) hem de periferik organlarda (örn. gastrointestinal sistem, hipofiz, pankreas) tespit edilmiştir (Ishida ve ark., 2012; Prinz ve ark., 2016). MSS içerisinde etkinliğini, G-

bağlı protein reseptörleri üzerinden hipotalamusta gösterirken (Brailoiu ve ark., 2007), melanokortin sistem aracılığıyla paraventriküler nükleusta (Maejima ve ark., 2009) ve nöropeptit Y (NPY) reseptörlerini hiperpolarize ederek arkuat nükleusta (Price, Samson, & Ferguson, 2008) gösterdiği rapor edilmiştir.

Sindirim sistemindeki orijinal olarak keşfedilen etkilerinin yanı sıra (iştaht kaybı, mide boşalması ve mide asit salgısının inhibisyonu, gastroduodenal motilite düzenlemesi gibi), nesfatin-1'in enerji homeostazı ile ilgili diğer önemli fonksiyonları vardır, örneğin enerji harcaması ve glukoz homeostazı. Ayrıca, kan basıncını ve kalp hızını artırma, stres tepkisi, davranış, uyku ve üreme gibi rolleri de vardır (Dore, Levata, Lehnert, & Schulz, 2017b).

Bir çalışma nesfatin-1'in nigral dopaminerjik (DA) nöronlarının elektriksel aktivitesini postsinaptik olarak bastırıldığını göstermiştir (Li ve ark., 2014). Ayrıca, DA nöronlarının anormal elektrofizyolojik özelliklerinin, Parkinson hastalığı (PH)'de hassasiyetlerinden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Sulzer, 2007). Nesfatin-1'in PD üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan başka bir deney (Shen ve ark., 2017) sonunda, nesfatin-1'in hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak DA nöronları üzerinde benzer koruyucu etkilere sahip olduğu ve PH için terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir. Nesfatin-1'in nöroprotektif etkisi, anti-apoptoz, anti-enflamasyon ve antioksidan stres ile ilişkili olabilir. Bununla birlikte, şu anda PH ile nesfatin-1 seviyelerindeki değişiklikler arasında bir bağlantıyı destekleyecek yeterli kanıt bulunmamaktadır.

Nesfatin-1'in beyindeki anti-enflamatuvar etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. Travmatik beyin hasarı rat modellerine dayanan bir çalışma, nesfatin-1'in verilmesinin NFκB gen ekspresyonunu ve TNF-α, IL-6 ve IL-1β konsantrasyonlarını önemli ölçüde azalttığını, bu da nesfatin-1'in NFκB'ye bağımlı enflamatuvar yanıtları baskılayabileceğini düşündürmektedir (Tang ve ark., 2012). Ayrıca, başka bir çalışma, subaraknoid kanama sonrası akut beyin hasarının nötrofil infiltrasyonunu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin artan seviyelerini nesfatin-1 tedavisi ile engellediğini göstermiştir (Özsavcı ve ark., 2011).

Nesfatin-1'in antioksidan kapasitesi, nöroprotektif potansiyeline ilişkin olası bir mekanizma olarak önerilmiştir. Antioksidan sistemin, ROS oluşumu ile eliminasyonu arasındaki denge için sorumlu olduğu genel olarak kabul edilir. Mitokondriyal ROS'ler, mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak sitoplazmaya

sitokrom C sızıntısına neden olur ve kaspaz-3 bağımlı apoptozu indükler (Kowaltowski, Castilho, & Vercesi, 2001).

MES23.5 DA nöronlarında nesfatin-1'in rotenon tarafından indüklenen mitokondriyal transmembran potansiyelinin çökmesini engellediği ve mitokondriyal solunum zinciri kompleks I fonksiyonunu geri kazandırdığı gösterilmiştir (Tan, Xu, Shen, & Jiang, 2015). Ayrıca, son bir çalışma, nesfatin-1'in serebral iskemi modellerinde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve antioksidan enzimlerin (SOD ve GSH) aktivitesini artırdığını güçlü bir şekilde önermiştir (Erfani ve ark., 2019). Nesfatin-1'in antioksidan kapasitesi subaraknoid kanama modellerinde de gösterilmiştir (Özsavcı ve ark., 2011).

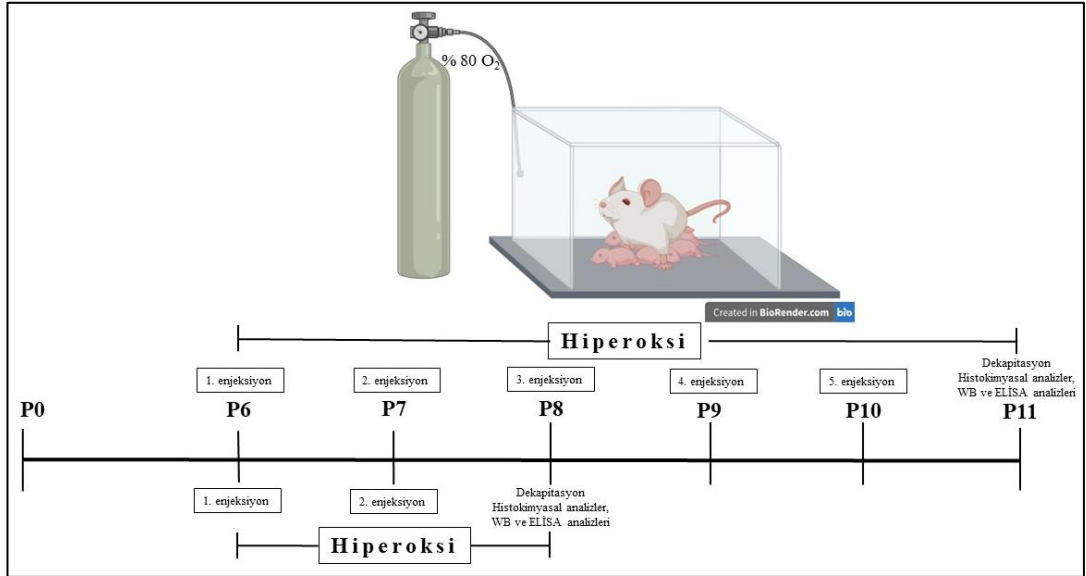
Nesfatin-1'in, rotenon ile indüklenen nörotoksisiteye karşı MES23.5 dopaminerjik nöronları koruduğu gösterilmiş ve koruyucu etkisini mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu iyileştirerek ve apoptozu inhibe ederek yaptığı düşünülmüştür (Tan ve ark., 2015). Bu ekip tarafından yapılan başka bir çalışma (Shen ve ark., 2017), nesfatin-1'in dopaminerjik nöronlarda anti-apoptotik etkisinin C-Raf/ERK1/2 bağımlı anti-apoptotik yolakla gerçekleştirildiğini ve nesfatin-1'in kaspaz-3 aktivitesini belirgin bir şekilde bastırarak apoptozun inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, protein kinase A (PKA) inhibitörünün nesfatin-1'in etkisini engellemediği, bu nedenle PKA yolağın anti-apoptotik mekanizmada yer almadığı düşünülmüştür.

Nesfatin-1'in nöroprotektif etkilerinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak belirlenememiştir, çünkü ilgili reseptör henüz klonlanmamıştır. NB41A3 nöral hücre hattında yapılan bir çalışma, nesfatin-1'in PKA yolağı yerine  $Ca^{2+}$  girişi ve/veya mitojenle aktifleşen bir protein kinaz (MAPK) sinyal yolunu fosforile etmek için kalsiyum girişi ve/veya MAPK sinyal yolunu kullanabileceğini göstermiştir (Ishida ve ark., 2012). Bunun aksine, başka bir çalışma, PKA aktivasyonunun sıçan hipotalamik nöronlarında  $Ca^{2+}$  girişi ile yakından ilişkili olduğunu öne sürmüştür (Brailoiu ve ark., 2007). Farklı sonuçlar, hipotalamik nöronlar ile NB41A3 hücreleri arasındaki farklılardan kaynaklanabilir. Ayrıca, bir çalışma, PKC yolağının sıçan dorsal kök gangliyon nöronlarında  $Ca^{2+}$  girişinden sorumlu olduğunu belirtmiştir (Ozcan ve ark., 2016). Tüm bunlar bir araya getirildiğinde, detaylı moleküler mekanizmaların daha fazla çalışılması gerekli olduğu anlaşılmaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nin 2020-05/10 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi HDP(T)-2020-26 ve TGA-2022-1173 no'lu projeleri kapsamında karşılandı. Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHYUAM)'nden temin edilen erişkin dişi ve erkek sıçanlar kontrollü bir şekilde çiftleştirildi. Aynı gün doğum yapan anne sıçanların yavruları karıştırıldı ve 6. günde 12,0 gr'ın üzerinde olan *Wistar albino* yenidoğan yavru, dişi/erkek farkına bakılmaksızın rastgele gruplara dağıtıldı. Literatürdeki çalışmalarda da aynı yaklaşım kullanılmakta ve kabul görmektedir (Brehmer ve ark., 2012; Sifringer ve ark., 2012). Anneleri eşliğinde yavrular 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü ile 18-24°C arasında gıda ve su kısıtlılığı olmadan standart koşullar altında ve ayrı ayrı kafeslerde takip edildi. Deney akış şeması Şekil 7'da gösterilmiştir.



Şekil 7. Deney akış şeması.

### 3.2. Çalışma Protokolü ve Deney Grupları

Planlanmış gebelikleri takip edilen anne sıçanlardan doğan yenidoğan yavrular anneleri ile birlikte postnatal 6. günde, 48 saat ya da 5 gün boyunca, gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan plexiglas kafes düzenek içerisinde %80 oksijene maruz bırakıldı ve bu süreler boyunca oksijen konsantrasyonu günde 2 kez monitorize edildi. Hiperoksi koşullarına maruz kalan anne sıçanlar 24 saatte bir normoksi koşullarında bulunan anne sıçan ile dönüşümlü olarak düzeneğin içerisine alındı. Düzenekteki, nem oranı %80'in üzerinde tutulup CO<sub>2</sub> soda-lime ile uzaklaştırıldı (Goren ve ark., 2017; Sifringer ve ark., 2009, 2010). Oda havasında (%21 O<sub>2</sub>) tutulan sıçanlar ile hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlar deney süresince BUÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda aynı ortamda bulunduruldu.

P6 sıçanlar aşağıdaki gibi gruplara ayrıldı (Tablo 2):

**Grup 1:** Normoksi + serum fizyolojik (SF) grubu: Hiperoksi uygulanmaksızın düzeneğin içinde oda havası solutulan ve intraperitoneal yolla %0,9 NaCl uygulanan denekler

**Grup 2:** Normoksi + Nesfatin-1 grubu: Hiperoksi uygulanmaksızın düzeneğin içinde oda havası solutulan ve belirlenen dozlarda ve zaman aralıklarında intraperitoneal yolla Nesfatin-1 peptiti uygulanan denekler

**Grup 3:** Hiperoksi + SF grubu: Hiperoksi uygulanan ve hiperoksi süresince belirlenen zaman aralıklarında intraperitoneal yolla %0,9 NaCl uygulanan denekler

**Grup 4:** Hiperoksi + Nesfatin-1 grubu: Hiperoksi uygulanan ve hiperoksi süresince belirlenen belirlenen dozlarda ve zaman aralıklarında intraperitoneal yolla Nesfatin-1 peptiti uygulanan denekler

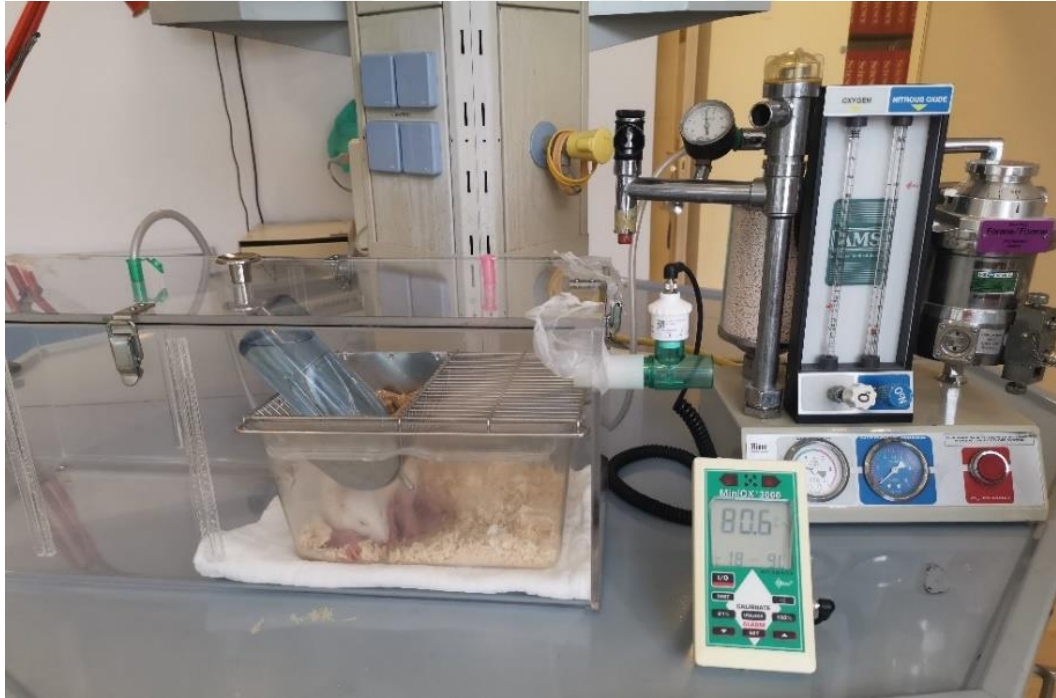
**Tablo2:** Deney grupları ve kullanılan deneklerin gruplara göre dağılımı

Test edilecek Nesfatin-1 dozu	10 µm/kg (n)		20 µm/kg (n)		20 µm/kg (n) Moleküler analizler için	
Nesfatin -1'in verilmiş sıklığı	Deneyin başlangıcında ve 2 gün ya da 5 gün süreyle, günde tek doz					
Süre	2 gün	5 gün	2 gün	5 gün	2 gün	5 gün
Normoksi+SF	5	5	5	5	5	5
Normoksi+nesfatin	5	5	5	5	5	5
Hiperoksi+SF	5	5	5	5	5	5
Hiperoksi+nesfatin	5	5	5	5	5	5

**Nesfatin dozu ve verilmiş sıklığı:** Çalışmada hiperoksida nesfatin-1'in (Nesfatin-1 (1-82) (Rat) peptide, Phoenix Pharmaceuticals, 003-22B) koruyuculuğunun ve etkin dozunun belirlenmesinde, erişkinde travmatik beyin hasarı ya da iskemi reperfüzyonda koruyucu olarak önerilen Nesfan-1 peptiti dozları olan 10 µg/kg ve 20 µg/kg doz test edildi (Tang ve ark., 2012). Kan-beyin bariyerini geçtiği bilinen Nesfatin-1 peptiti deneklere intraperitoneal enjeksiyon ile verildi. Gerek Nesfatin-1 peptiti ve gerekse SF, normoksi ve hiperoksinin başlangıcında ve deneklerin hiperoksiye maruz kalacağı sürede (2 gün ya da 5 gün) tek doz/gün olarak uygulandı. Hiperoksinin bitiminde denekler aşağıda açıklandığı gibi sakrifiye edildi. Diğer bir grupta ise moleküler analizler için taze doku elde etmek amacıyla deneklere aynı şekilde hiperoksinin başlangıcında ve deneklerin hiperoksiye maruz kalacağı sürede (2 gün ya da 5 gün) 20 µg/kg/gün tek doz nesfatin-1 peptiti verildi. Literatürde ne hiperoksi modelinde ne de yeni doğanda nesfatin-1 peptitinin kullanımı ile ilgili veriye rastlanmamıştır. Çalışmada test edilecek dozların belirlenmesinde, erişkinde travmatik beyin hasarı ya da iskemi reperfüzyonda korucu olarak önerilen nesfatin-1 peptit dozu olan 10 µg/kg/gün ve 20 µg/kg/gün baz alınmıştır (Tang ve ark., 2012).

### 3. 3. Hiperoksik Beyin Hasarının Oluşturulması

Gebeliği planlanmış spontan doğumu takiben, doğdukları gün 0 olarak kabul edilen yavru sıçanlar (P0), 6. günde (P6) 48 saat veya 5 gün süreyle; normoksi grubunda oda havasına (%21 O<sub>2</sub>), hiperoksi grubunda ise %80 O<sub>2</sub> maruz bırakıldılar. Hiperoksi uygulaması sürekli oksijen akış sistemi sürdürülen 60x20x20 cm (GxDxY) boyutlarında kontrollü gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan plexiglas düzenek içine anestezi cihazı (Minor 612, AMS Türkiye) aracılığı ile sağlanmış olup nem oranı %80'in üzerinde tutulmuş ve CO<sub>2</sub> soda-lime ile uzaklaştırılmıştır (Gören ve ark., 2017). Düzenegin içindeki oksijen seviyesi %80 oksijen doygunluğunu korumak için MiniOX 3000 oksijen analizörü (Ohio Medical Corporation, Gurnee, IL, ABD) ile sürekli izlenmiştir (Şekil 8). Bu dönemdeki yavru sıçanların beyin gelişimi, insanda preterm yenidoğana karşılık gelmektedir (Dobbing, & Sands, 1979).



Şekil 8. Hiperoksik beyin hasarı oluşturulan düzenek.

### 3. 4. Beyin Dokularının Eldesi

Histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için dokuların hazırlanması: Son nesfatin-1 enjeksiyonundan 24 saat sonra, derin eter anestezisi altında perfüzyon

fiksasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Bu yöntemde, derin anestezi verilen deneklerin toraksları açılarak ve transkardiyak olarak aortaya, deneklerin kan basıncına uygun olarak ayarlanan, perfüzyon pompasına bağlı bir kateter yerleştirildi. Bu kataterden dolaşım sistemine önce %0,9'luk SF gönderilerek damarlar kandan temizlendi. Ardından fiksatif olarak taze hazırlanmış %4'lük paraformaldehit solüsyonu (30 ml/denek) perfüze edildi. İşlemin ardından denekler dekapite edildi ve beyin dokuları hassas bir şekilde çıkarıldı. Perfüzyon fiksasyon ile sakrifiye edilen deneklerin beyinleri +4°C'de 24 saat süreyle perfüzyon işleminde kullanılan fiksatifte postfiksasyona bırakıldı.

Moleküler analizler için dokuların hazırlanması: Genel anestezi uygulanan denekler dekapite edildi, olfaktor bulbus ve beyincik uzaklaştırıldıktan sonra beyin yarımküreleri analizler yapılincaya kadar -80°C'de saklandı.

### 3.5. Işık Mikroskopik Preparasyon

Tüm gruplardan ışık mikroskopik incelemeler için alınan beyin doku örnekleri perfüzyon fiksasyonunun ardından %4'lük paraformaldehit ile post-fiksasyon uygulandı. Dokular fikse olduktan sonra yenidoğan sıçan beynine uygun bir doku takibi protokolü ile parafin blok haline getirildi (Tablo 3).

**Tablo 3.** Doku Takip protokolü

Sıra	İşlem	Süresi
1	%30'luk alkol	90 dakika
1	%50'lik alkol	90 dakika
2	%70'lik alkol	120 dakika
3	%90'lik alkol	120 dakika
4	%96'lik alkol-I	120 dakika
5	%96'lik alkol-II	Gece boyu
6	Ksilen I	60 dakika
7	Ksilen- II	60 dakika
8	Parafin-I	90 dakika
9	Parafin-II	60 dakika
10	Parafin-III	60 dakika
11	Gömme	

Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) yardımıyla 5 µm kalınlığında ardışık seri koranal kesitler, Sıçan Beyin Atlası'na göre (Paxinos, & Watson, 2009), bregma -2.76 mm ile -4.20 mm aralığındaki bölgeden, kesit aralığı 25 µm olacak şekilde alındı. Bu ardışık kesitlerin bir serisi nöron sayılarının değerlendirilmesi için %0,5 krezil violet boyası ile boyandı.

### 3.5.1. Krezil Violet Boyaması

Krezil violet boyaması için alınan kesitler 1 gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra ksilen ile deparafinize edildi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Krezil violet boyama protokolü

Sıra	İşlem	Süresi
1	%96'lık alkol	3 dakika
2	%90'lık alkol	3 dakika
3	%70'lik alkol	3 dakika
4	Distile su	5 dakika
5	%0,5'lik krezil violet boyası	5 dakika
6	Distile su	10 dips
7	%70'lik alkol	7 dips
8	%90'lık alkol	7 dips
9	%96'lık alkol	7 dips
10	Ksilen-I	20 dakika
11	Ksilen-II	20 dakika
12	Lamların kapatılması	

**Hücre Sayımı:** Krezil violet boyalı kesitlerde kortekste hücre sayımları iki farklı araştırmacı tarafından kör olarak yapıldı. Hücre sayımları, 40X objektif büyütmesi ile her denek için Sıçan Beyin Atlası'na göre (Paxinos, & Watson, 2009) rostro-kaudal planda bregma -2,76 mm ile -4,20 mm aralığında birbirine eş uzaklıkta 6 farklı seviyeden alınan 6 kesitte, bilateral rasgele seçilen  $3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 'lik 8 alanda sayıldı.

**Korpus Kallosum Ölçümleri:** Korpus kallozum kalınlığının değerlendirilmesi için her denek için aynı olmak üzere bregma +0.48 mm – bregma -0,46 mm aralığında farklı seviyelerinden alınan birbirine eş uzaklıkta altı koronal kesitte orta hatta korpus kallozum kalınlığı ölçüldü. Ölçümler Olympus BX-FLA Reflected Light Flourescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopla dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinden yapıldı.

### 3.6. Moleküler Analizler

#### 3.6.1. Western Blotting protokolü

Her gruptan genel anestezi uygulanan yavruların beyin dokuları eksize edildi ve olfaktor bulbus ile beyincik kısımları uzaklaştırıldı. Her bir beyin yarımkürelerinin ağırlıkları ölçülerek ağırlığının 20 katı hacimde Fosfat Buffer Salin (PBS) (Soğuk ve pH 7,4) tamponu içerisinde homojenize edildi. Tüm homojenatların içerdiği total protein miktarı Lowry yöntemine (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) göre analiz edildi. Total protein içeriği belirlenen homojenat süpernatantları 1:1 oranında Laemmli tamponu (Laemmli, 1970) ile karıştırılarak renkli solüsyon elde edildikten sonra protein denatürasyonu gerçekleştirmek amacıyla 90°C'de 5 dakika kaynatıldı. Her örnek, eşit miktarlarda protein (20 µg) içerecek şekilde SDS jellere yüklendi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak 175 mV da 1 saat yürütüldü. Jelde yürütülen protein bantları poliviniliden florür (PVDF) transfer membranlara (MSPVDF04530301 Lot#18502026, MA, ABD) (400mA) aktarıldı. Bu çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorların listesi tablo 5'de, western blot protokolü Tablo 6'da verilmiştir. Protein-antikor kompleksleri, bir dijital tarayıcı (C-Digit Blot Scanner; Licor Biosciences, Lincoln, NE, ABD) kullanılarak görüntülendi. İmmunoreaktif bantlar, tarayıcının yazılımı kullanılarak densitometrik olarak karşılaştırıldı. Yenidoğan sıçan beyin dokusunda Beklin-1, Atg 5, LC3A-B, Bcl-2, BAX, cleaved-caspase 3 ve IL-18 protein düzeyleri GAPDH protein düzeyleri ile oranlanarak, protein bantlarının ortalama dansitelerinin kat değeri olarak değerlendirildi. Absorbans eğrisi altındaki alanlar isteğe bağlı birimler olarak ifade edildi ve normoksi+SF grubundan numunelerin yüzdeleri olarak normalleştirildi.

**Tablo 5:** Primer ve sekonder antikorların listesi

	<b>Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Katalog no</b>
<b>Primer antikorlar</b>	Anti-Atg5 tavşan mAb (1/1000)	Cell Signaling Technology	12994
	Anti-Beklin-1 tavşan pAb (1/1000)	Cell Signaling Technology	3738
	Anti-LC3A/B tavşan mAb (1/1000)	Cell Signaling Technology	12741
	Anti-Bcl-2 tavşan pAb (1/1000)	BT LAB	BT-AP00858
	Anti-BAX tavşan pAb (1/1000)	BT LAB	BT-AP00842
	Anti-GAPDH tavşan pAb (1/2000)	BT LAB	BT-AP03467
	Anti-IL18 tavşan pAb (1/500)	Affinity Bioscience	DF6252
	Anti-Cleaved-Caspase 3 tavşan pAb (1/1000)	Affinity Bioscience	AF7022
<b>Sekonder antikorlar</b>	Peroxidase-conjugated anti-fare IgG (1/5000)	Cell Signaling Technology	7076S
	Peroxidase-conjugated eşek anti-tavşan IgG (H+L) (1/50000)	Jackson ImmunoResearch	711-035-152

**Tablo 6.** Western blot protokolü

---

<b>Western Blot Protokolü</b>	
1.	Western blot cihaz sistemi kurularak %12'lik separating jel ve %4 stacking jel hazırlandı.
2.	%4'lük jel polimerize olurken protein örnekleri uygun miktarda ayarlanarak (20 µg total protein) yükleme tamponu ile karıştırılarak ve 95°C'de 5 dakika denatüre edildi.
3.	Polimerizasyon tamamlanınca taraklar çıkarılıp jeller tanka alınarak ortalarına alt kısmını da kapatacak şekilde running buffer eklendi.
4.	Ledder (4 µl) ve proteinler sırasıyla kuyucuklara yüklendi.
5.	Running buffer max seviyeye kadar dolduruldu. Elektroforez başlatıldı (V:175 Time:60 dakika).
6.	Yürütme sırasında PVDF membranlar 5-10 dakika metanolde aktive edildikten sonra TBS-T'ye alındı.
7.	Yürütme bitiminde jellerin %4'lük kısımları ayrıldı ve jeller cam plaklardan kaldırılarak transfer solüsyonuna alındı (15dakika).
8.	Süre sonunda yürütme sırasında transfer bufferda ıslatılmış olan süngerler ve kurutma kağıtları kullanılarak sandwich (siyah plaka-sünger-kurutma kağıdı-jel-PVDF membran-kurutma kağıdı-sünger- kırmızı plaka) ıslak olarak hazırlandı.
9.	Sandwichler tanka yerleştirildi ve tank transfer buffer ile dolduruldu.
10.	MA:400 time:60dakika olacak şekilde transfer başlatıldı.
11.	Transfer sonrası PVDF membranlar 3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.
12.	%5'lik yağsız süt tozu ile blocking gerçekleştirildi (30 dakika).
13.	Blocking solüsyonu uzaklaştırılarak uygun dilüsyonda hazırlanan primer antikora alınan membranlar +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı
14.	3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.
15.	Sekonder antikora alınarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
16.	3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.
17.	Görüntüleme yapıldı.

---

### 3.6.2. ELİSA

Daha önceden tartılmış ve PBS içinde homojenat haline getirilen beyin dokuları 2500 r.p.m.'de +4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar analizlerin yapılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı. Kullanılan kitlerin talimatları doğrultusunda tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler hazırlandı. Reaktifler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Test oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kit protokolü Tablo 7'da verildi.

BDNF enzimi için; çözdürülen dokular NEPENTHE Araştırma Teknolojileri firmasına ait Rat Brain derived neurotrophic factor, BDNF ELISA Kit ile sıçan spesifik çift antikor sandviç yöntemi esas alınarak çalışıldı. Sonuçlar pg/mL protein olarak verildi. (NEPENTHE Araştırma Teknolojileri Rat Brain derived neurotrophic factor, BDNF ELISA Kit. Cat. no: NE010047603. Kocaeli).

GDNF enzimi için; çözdürülen dokular NEPENTHE Araştırma Teknolojileri firmasına ait Rat Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF ELISA Kit ile sıçan spesifik çift antikor sandviç yöntemi esas alınarak çalışıldı. Sonuçlar pg/mL protein olarak verildi. (NEPENTHE Araştırma Teknolojileri Rat Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF ELISA Kit. Cat. no: NE010035103. Kocaeli).

SOD enzimi için; çözdürülen dokular NEPENTHE Araştırma Teknolojileri firmasına ait Rat Super Oxidase Dismutase, SOD ELISA Kit ile sıçan spesifik çift antikor sandviç yöntemi esas alınarak çalışıldı. Sonuçlar pg/mL protein olarak verildi. (NEPENTHE Araştırma Teknolojileri Rat Super Oxidase Dismutase, SOD ELISA Kit. Cat no: NE010016803. Kocaeli).

GPx-1 enzimi için; çözdürülen dokular NEPENTHE Araştırma Teknolojileri firmasına ait Rat Glutathione peroksidase 1, GPx-1 ELISA Kit ile sıçan spesifik çift antikor sandviç yöntemi esas alınarak çalışıldı. Sonuçlar pg/mL protein olarak verildi. (NEPENTHE Araştırma Teknolojileri Rat Glutathione peroksidase 1, GPx-1 ELISA Kit. Cat no: NE010117203. Kocaeli).

**Tablo 7.** ELISA Kit protokolü

ELISA Kit Protokolü	
1.	Standart kuyucuklarına 100 µl Standart eklendi.
2.	Kuyucuklara 100 µl Standart Dilüent Tampon eklendi.
3.	Numune kuyucuklarına 100 µl numuneler eklendi.
4.	Plaka bir kapatıcı ile örtüldü ve 37°C'de 80 dakika inkübe edildi.
5.	Kapatıcı açıldı ve plaka yıkama tamponuyla 3 kez yıkandı. (Her bir kuyuyu çoklu kanallı otomatik pipet kullanarak Yıkama Tamponu (~250 µl) ile doldurarak yıkandı. Her adımda sıvının tamamen çıkarılmasına dikkat edilerek iyi bir performans elde etmeye çalışıldı. Son yıkamadan sonra plakayı kağıt havlulara veya diğer emici malzemelere iyice bastırılarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı.
6.	Her kuyucuğa 100 µl Biotin-Konjuge çözeltisi eklendi. İyi karıştırıldı ve yapışkan filmlerle kapatıldı. 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.
7.	Film çıkarıldı ve plaka yıkama tamponuyla 3 kez yıkandı.
8.	Her kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP eklendi. Plaka yapışkan filmlerle kapatıldı ve 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.
9.	Film çıkarıldı ve plaka yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.
10.	Her kuyucuğa 90 µl TMB Substrat Çözeltisi eklendi. 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Plaka karanlık bir ortamda tutuldu ve doğrudan ışığa maruziyetten korundu. (30 dakikayı geçmeyecek şekilde inkübatördeki plakanın en yüksek standart konsantrasyonunu içeren ilk dört kuyucuk belirgin mavi renk geliştirmesi izlendi)
11.	Her kuyucuğa 50 µl Durma Çözeltisi eklendi; mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
12.	Takibinde (durma çözeltisi ekledikten sonraki 10 dakika içinde) mikrolaka okuyucusunda her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) 450 nm'ye ayarlanarak ölçüldü.

### 3.7 İstatistiksel Analiz

Sayısal verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) (SPSS) programı ve grafiklerin oluşturulmasında ise SigmaPlot 10.0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanıldı. Hücre sayılarının gruplar arası istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde Kruskal Wallis testi, ikili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Miyelinizasyonun değerlendirilmesinde deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Tukey testi ile yapıldı. Moleküler analizlerde deney grupları arası istatistiksel farklılıkların belirlenmesi Kruskal Wallis testi ve ANOVA testi ile yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart ortalama hatası (SEM) olarak ifade edildi;  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Nesfatin-1 Peptitinin Yeni Doğan Sıçan Hiperoksik beyin hasarında Korteks Nöron Sayısı Üzerine Etkisi

Çalışmada normoksi ve hiperoksi gruplarını oluşturan yenidoğanlarda nesfatin-1 peptitinin korteks nöron sayılarının üzerine etkisini saptamak için kretil violet ile boyanan beyin kesitleri değerlendirildi. Sayımlar, Sıçan Beyin Atlası'na (Paxinos & Watson, 2009) göre; Bregma 2,76 mm/Bregma 4,20 mm arasında, kesit kalınlığı 5 µm ve kesit aralığı 25 µm olan 6 kesitte, her bir kesit üzerinde  $3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 'lik bilateral dörder alanda yapıldı.

Gruplara göre kretil violet ile değerlendirilen korteks nöron sayılarına ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 8'de verilmiştir ve istatistiksel karşılaştırmalarda (Kruskal Wallis testine göre) gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. İkili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapılmış ve karşılaştırmalarda  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

**Tablo 8.** Gruplara göre korteks nöron sayıları ortalama ve standart sapma değerleri

	5 Günlük Grup Ort. ± SEM*	2 Günlük Grup Ort. ± SEM*
Normoksi + SF	71,51±1,15	80,86±3,90
Hiperoksi + SF	56,78±1,78	79,68±6,18
Hiperoksi + NES20	78,25±3,51	90,68±13,33
Normoksi + NES20	96,77±8,42	103,51±7,29
Hiperoksi + NES10	65,35±2,38	95,54±13,99
Normoksi + NES10	71,29±2,94	89,56±14,15

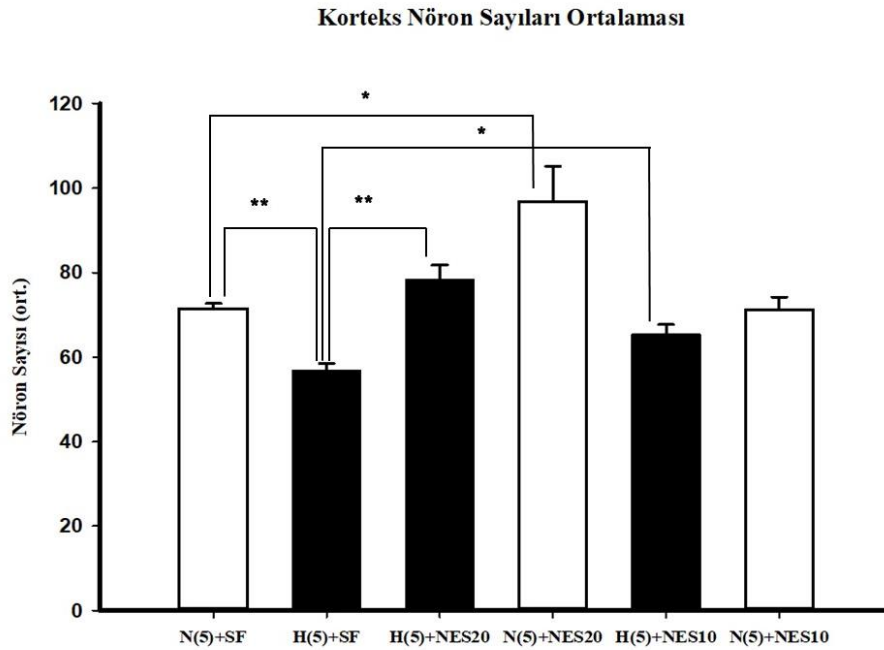
\*n=5

NES20: 20 µg/kg dozunda nesfatin verilen grup

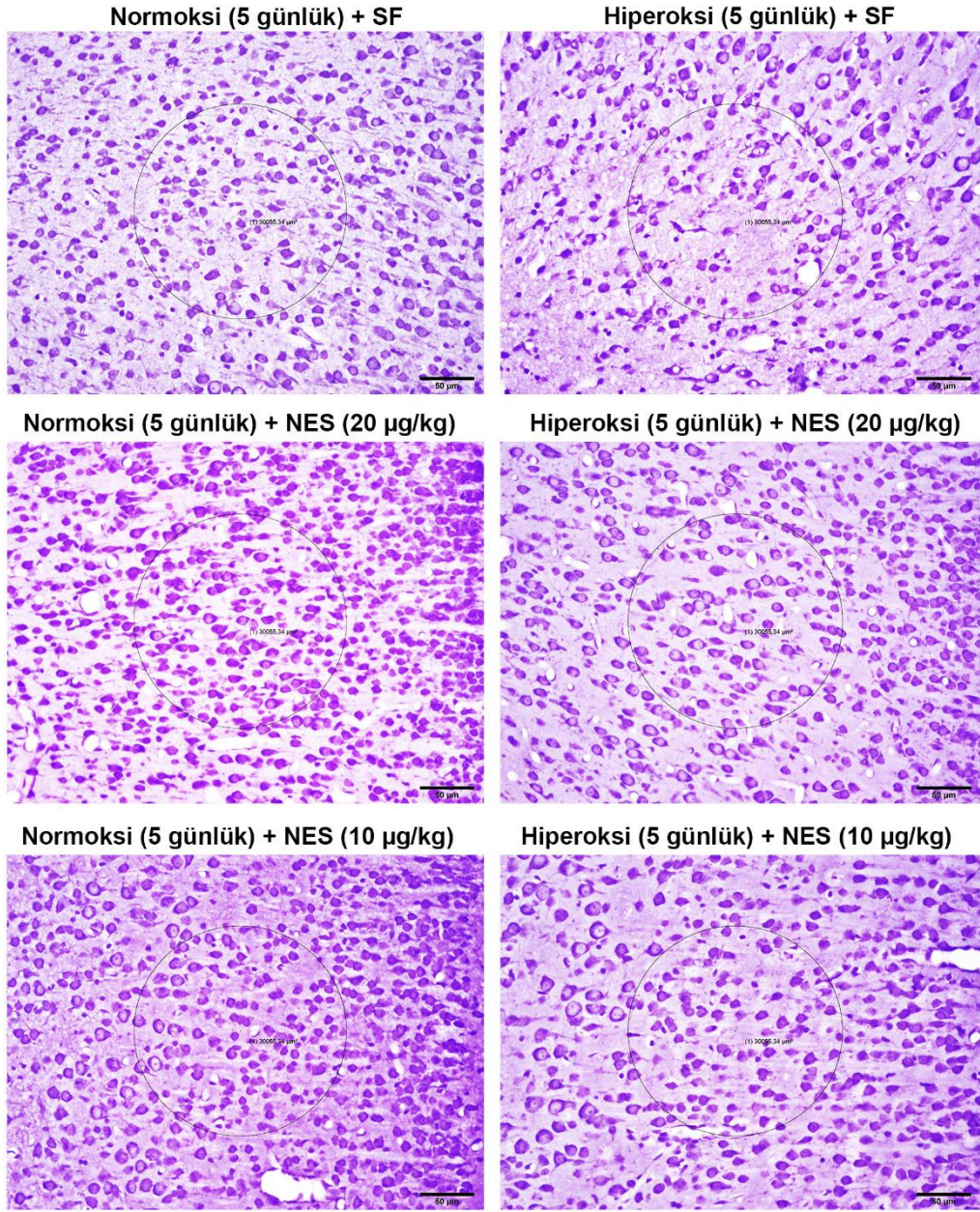
NES10: 10 µg/kg dozunda nesfatin verilen grup

5 günlük grupta, H(5)+SF grubu ile N(5)+SF grubu karşılaştırıldığında korteks nöron sayılarının anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ( $p=0,003$ ). 5 günlük hiperoksi süresince SF ya da 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  nesfatin verilen gruplar karşılaştırıldığında, 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozda nesfatin uygulamasının korteksteki nöron sayısını anlamlı ölçüde arttırdığı belirlendi ( $p=0,004$ ). Ayrıca 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozda nesfatin-1 uygulamasının normoksik koşullarda da korteksteki nöron sayısında artmaya neden olduğu ve normoksik koşullarda 5 gün süre ile SF uygulanan grupla karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olduğu görülmüştür ( $p=0,005$ ).

10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  nesfatin-1 etkisini değerlendirdiğimizde; 5 günlük hiperoksi uygulaması sırasında hergün SF verilen grup ile NES10 grubu karşılaştırıldığında 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozda nesfatin uygulamasının korteksteki nöron sayısını anlamlı ölçüde artırdığı görülmüştür ( $p= 0,045$ ) (Şekil 9 ve Şekil 10).

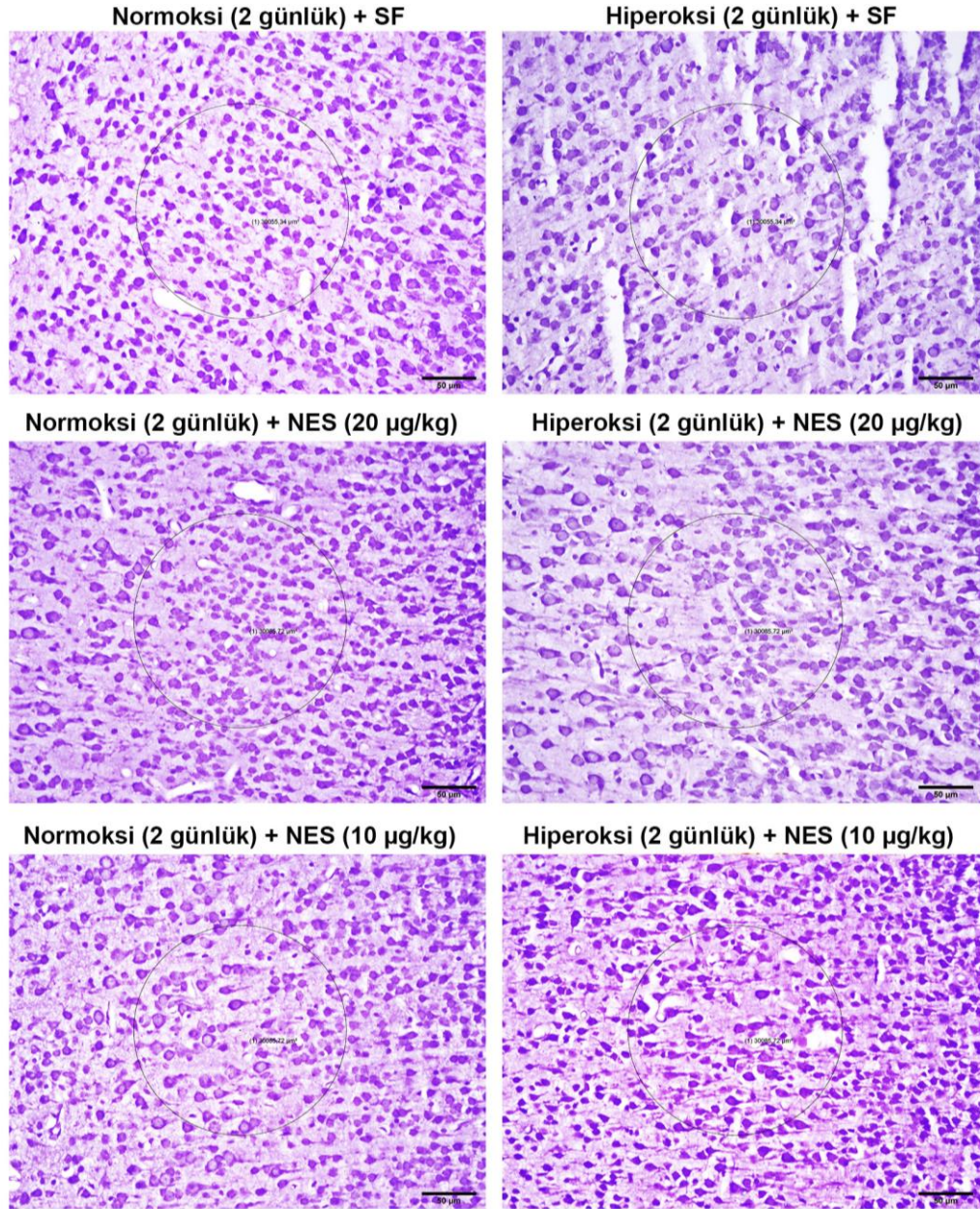


**Şekil 9.** 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda korteks nöron sayıları grafiksel gösterimi (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).



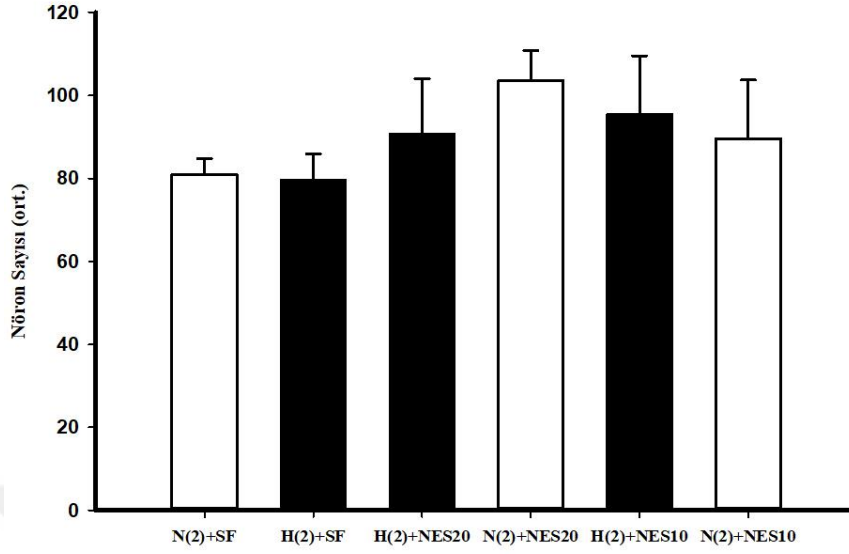
**Şekil 10.** 5 gün boyunca uygulama yapılan grupların krezil violet ile boyanan beyinlerinde kortekslerin ışık mikroskopik görüntüsü (40x).

2 gün boyunca hiperoksi ve normoksiye maruz bırakılan ve ip olarak 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  ve 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozda nesfatin-1 enjeksiyonu yapılan deney grupları arasından korteks nöron sayıları bakımından anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 11 ve Şekil 12).



Şekil 11. 2 gün boyunca uygulama yapılan grupların krezil violet ile boyanan beyinlerinde kortekslerin ışık mikroskopik görüntüsü (40x).

### Korteks Nöron Sayıları Ortalaması



Şekil 12. 2 gün boyunca uygulama yapılan grupların korteks nöron sayıları grafiksel gösterimi.

## 4.2. Nesfatin-1 Peptininin Yeni Doğan Sıçan Hiperoksik Beyin Hasarında Miyelinizasyon Üzerine Etkisi

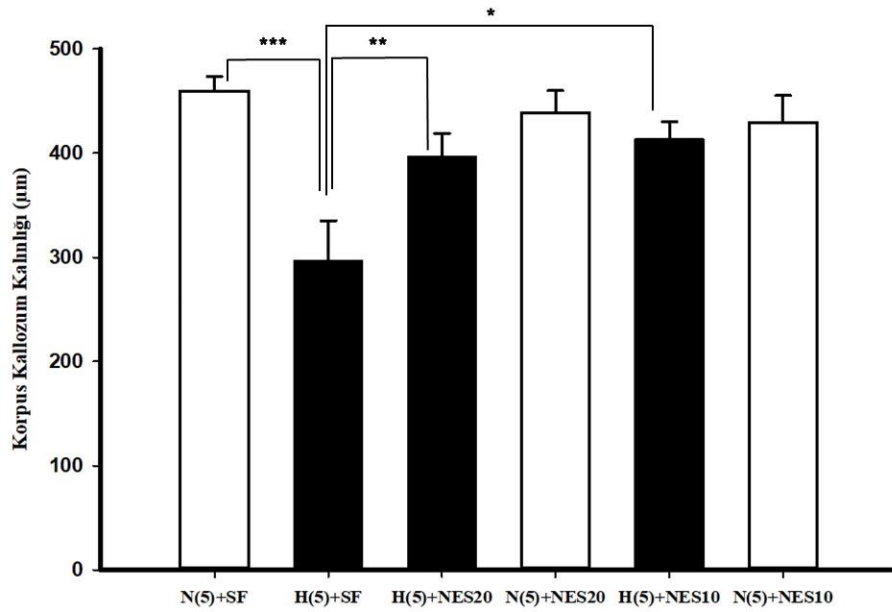
Sıçan yenidoğanlarında miyelinizasyon, korpus kallozum kalınlığının ölçülmesi ile değerlendirildi. Gruplara göre korpus kallozum kalınlığı ölçümlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 9 verilmiştir. Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Tukey testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

Tablo 9. Gruplara göre korpus kallozum ölçümleri ortalama ve standart sapma değerleri.

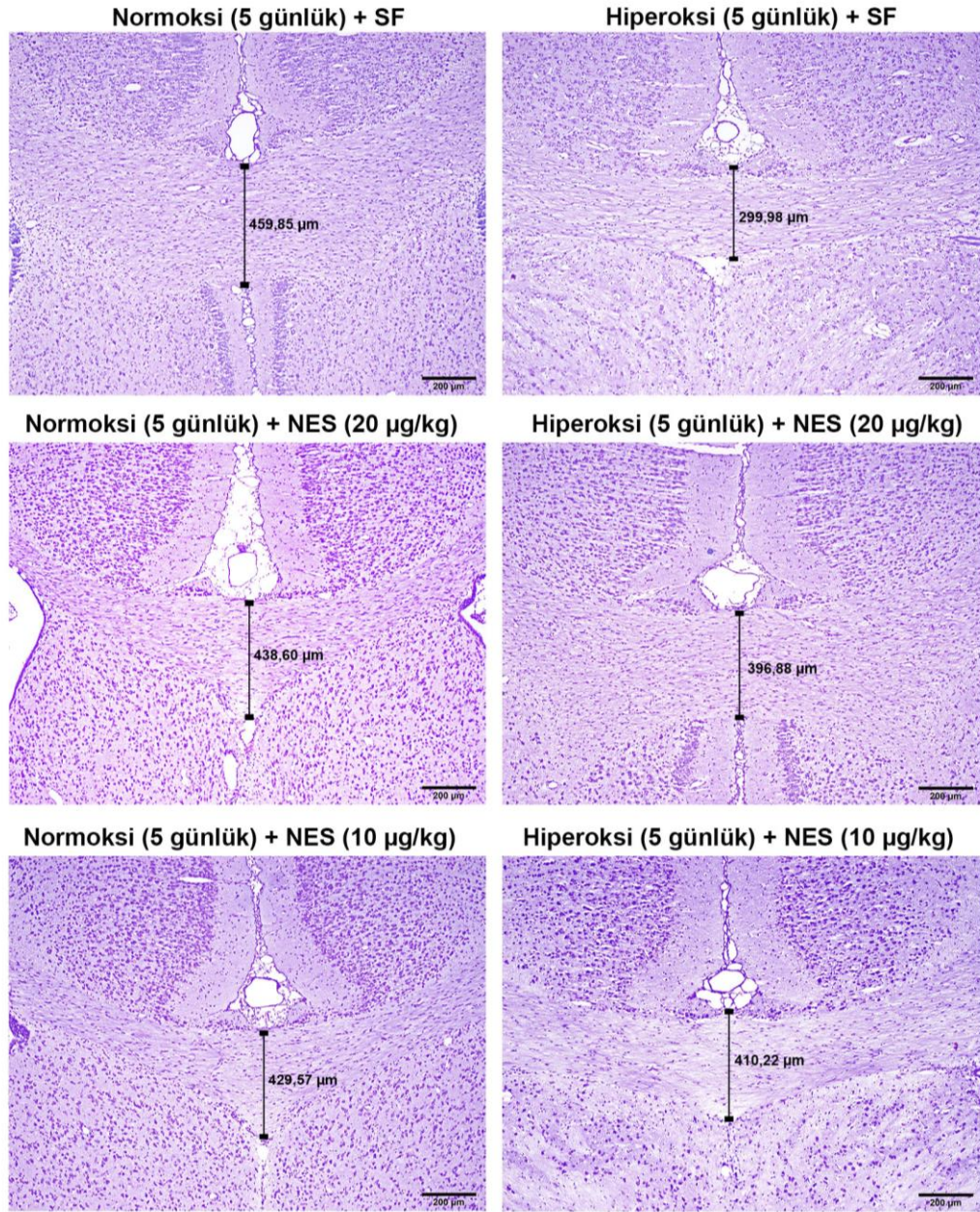
	5 Günlük Gruplar Ort. ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM*	2 Günlük Gruplar Ort. ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM*
Normoksi + SF	459,66 $\pm$ 13,99	479,57 $\pm$ 33,49
Hiperoksi + SF	296,45 $\pm$ 38,74	355,84 $\pm$ 15,07
Hiperoksi + NES20	396,31 $\pm$ 22,14	455,58 $\pm$ 22,08
Normoksi + NES20	438,53 $\pm$ 21,31	434,28 $\pm$ 36,92
Hiperoksi + NES10	413,24 $\pm$ 16,81	448,37 $\pm$ 63,98
Normoksi + NES10	429,714 $\pm$ 25,80	502,33 $\pm$ 37,72

\*n=5

5 gün süresince hiperoksiye maruz biralıp SF verilen grup ile normoksik koşullarda tutulan ve SF verilen grup karşılaştırıldığında korpus kallozum kalınlığının anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ( $p=0,001$ ). Hiperoksi (5)+SF ve hiperoksi(5)+NES20 grupları karşılaştırıldığında 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozda nesfatin uygulamasının kallozum kalınlığını anlamlı ölçüde artırdığı görülmüştür ( $p=0,045$ ). Araştırdığımız bir diğer doz olan 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nesfatin-1 etkisini değerlendirdiğimizde; hiperoksi(5)+SF ve hiperoksi(5)+NES10 grupları karşılaştırıldığında 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dozda nesfatin uygulamasının korpus kallozum kalınlığını anlamlı ölçüde artırdığı görüldü ( $p=0,013$ ) (Şekil 13 ve Şekil 14).

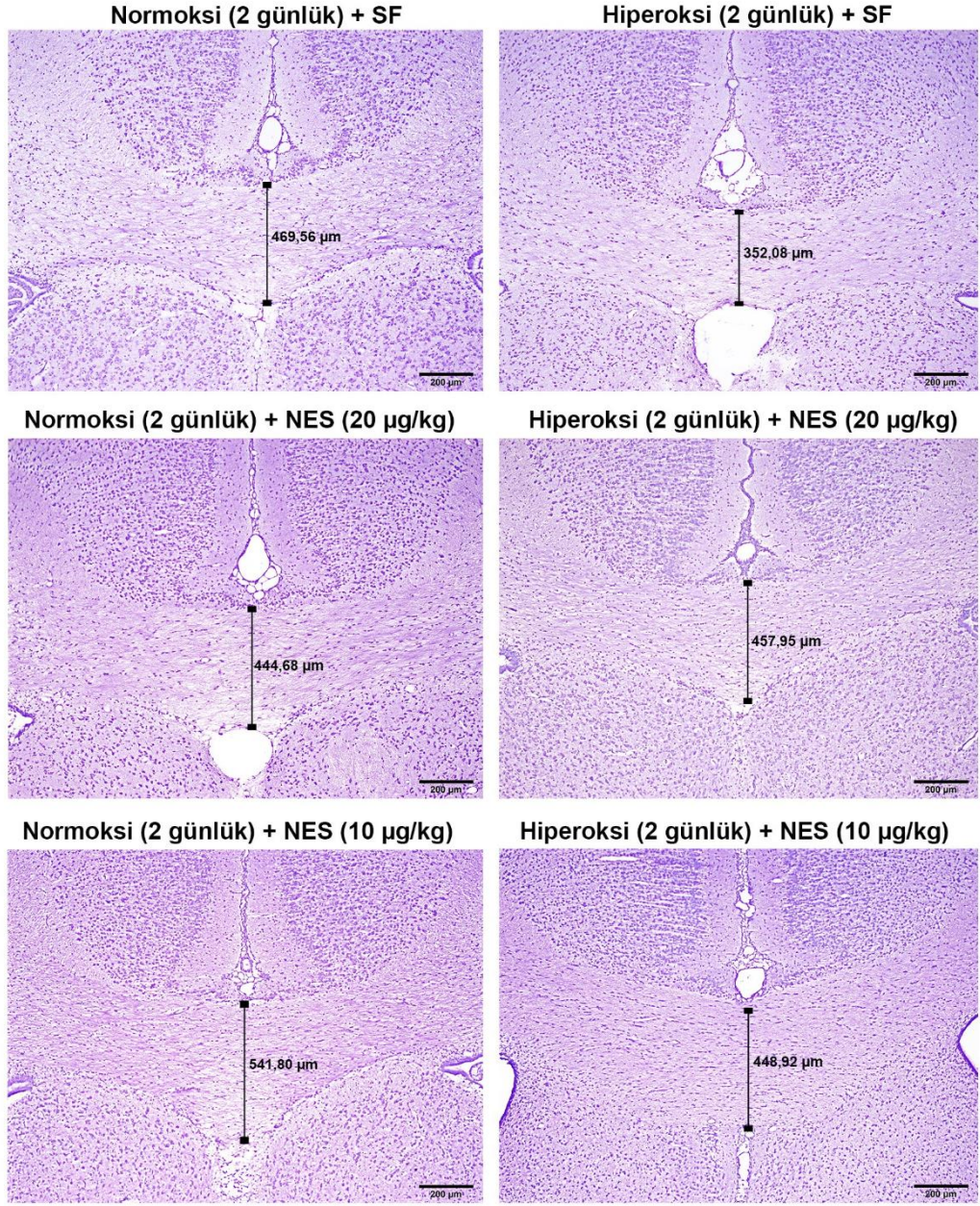


**Şekil 13.** 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda korpus kallozum kalınlığı ölçümünün grafiksel gösterimi (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

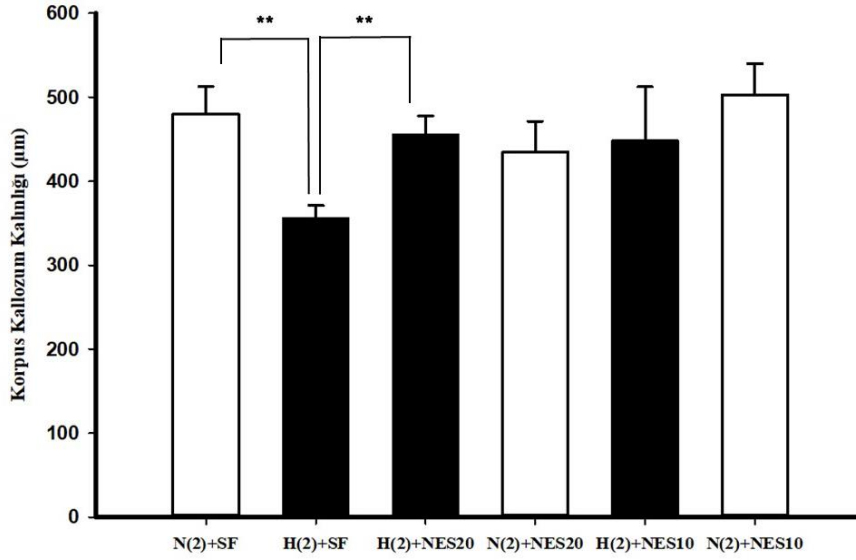


**Şekil 14.** 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda korpus kallozum kalınlığı ölçümü için temsili görüntüler.

İki gün boyunca hiperoksi + SF ile iki gün normoksi + SF grupları karşılaştırıldığında hiperoksi maruziyetinin korpus kallozum kalınlığını anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür ( $p=0,009$ ). Hem 20 µg/kg/gün hem de 10 µg/kg/gün dozda Nesfatin-1 uygulaması hiperoksiye maruz kalan deneklerde kallozum kalınlığını arttırdığı belirlenmiştir. Ancak bu artış 20 µg/kg/gün dozunda nesfatin-1 uygulanan grupta istatistiksel anlamlılık ( $p=0,033$ ) gösterirken, NES10 anlamlı değildi (Şekil 15 ve Şekil 16).



**Şekil 15.** 2 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda korpus kallozum kalınlığı ölçümü için temsili görüntüler.



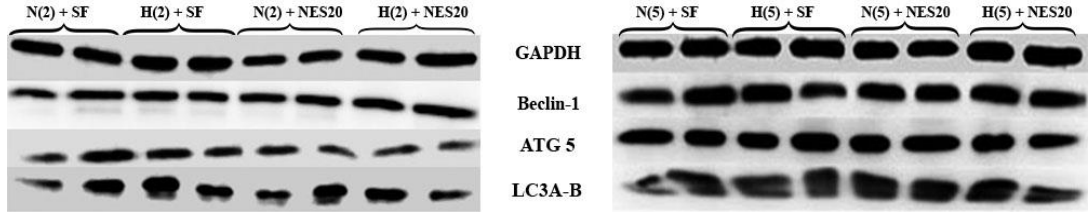
**Şekil 16.** 2 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda korpus kallozum kalınlığı ölçümünün grafiksel gösterimi (\*p<0,05; \*\*p<0,01)

### 4.3. Nesfatin-1 Peptitinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Otofaji Üzerine Etkisi

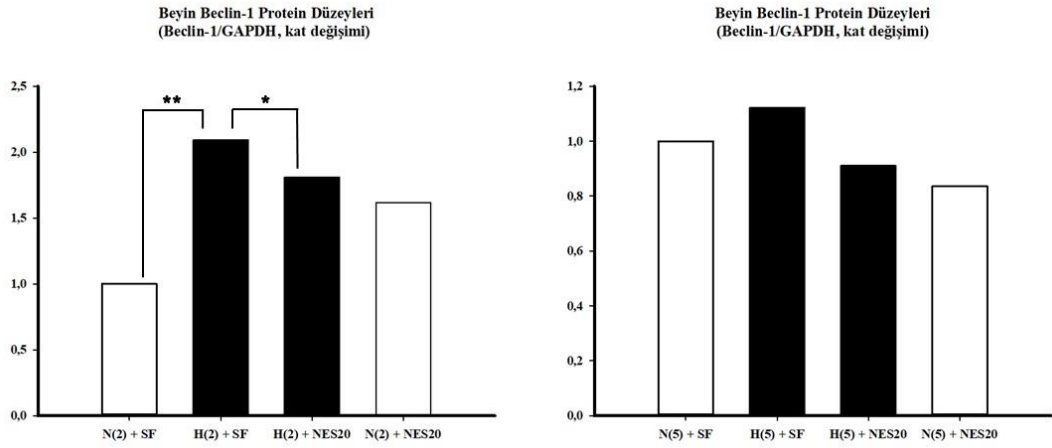
Nesfatin-1'in otofaji üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, preotofagozomal yapılarda lokalize olan ve nükleasyon sürecinde işlev gören beclin-1, vezikül genişlemesi ve tamamlanma işlev gören Atg5 veya otofagosom zarının ana bileşenlerinden biri olan ve otofagosom oluşum ile otofajik hücre ölümü için belirteç olarak kullanılan microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişiklikler western blotting yöntemi ile araştırıldı. Yenidoğan sıçan beyin dokusunda beclin-1, ATG 5, LC3A-B protein düzeyleri GAPDH protein düzeyleri ile oranlanarak, protein bantlarının ortalama dansitelerinin kat değeri olarak değerlendirildi.

Gruplara göre western blotting analizi ile değerlendirilen beyin beclin-1/GAPDH protein düzeylerinde istatistiksel karşılaştırmalarda; normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda anlamlı olarak arttığı (p=0,005) görüldü. Ayrıca İki ünlük hiperoksi süresince 20 µg/kg/gün nesfatin uygulamasının, hiperoksi (2)+SF grubuna göre beclin-1/GAPDH protein düzeylerini anlamlı olarak azalttığı

( $p=0,026$ ) tespit edildi (Şekil 17 ve Şekil 18). Ancak 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

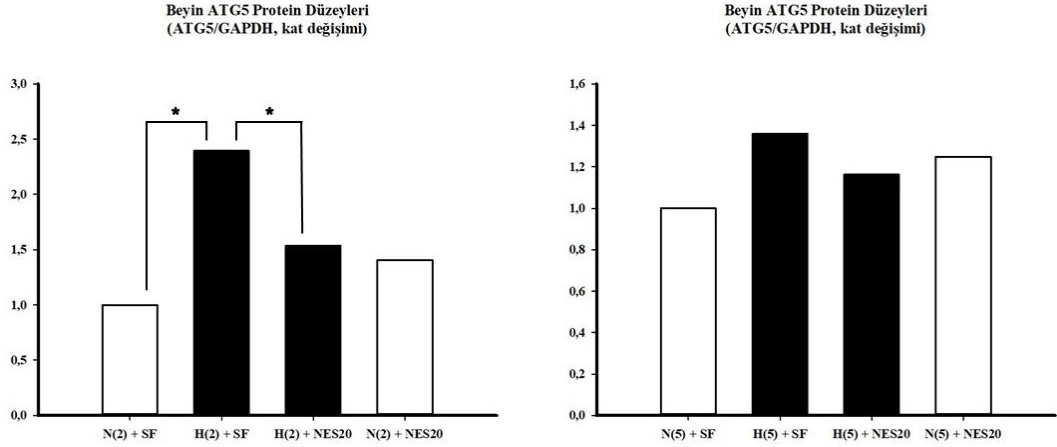


**Şekil 17.** 2 gün ve 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda otofaji belirteç protein ekspresyonlarının western blot yöntemi ile protein bantların gösterilmesi.



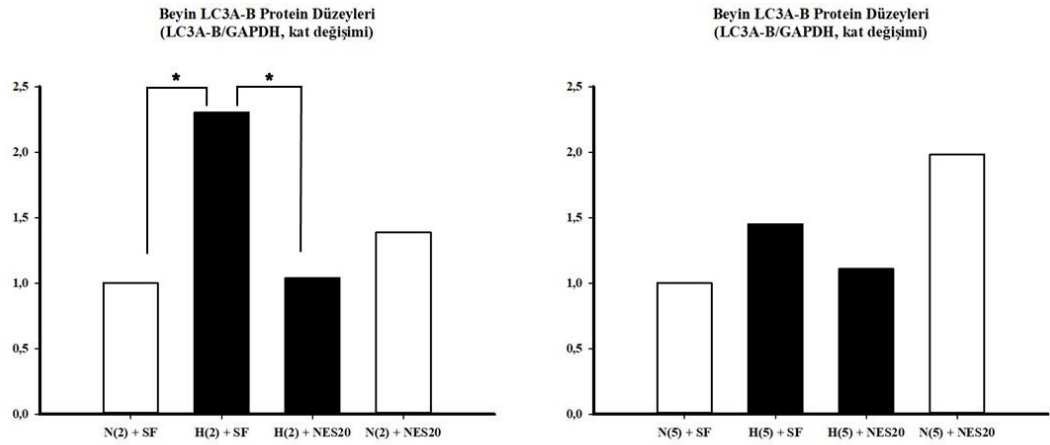
**Şekil 18.** Beyin beclin-1 (Beclin-1/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

İstatiksel karşılaştırmalarda; 2 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında beyin ATG 5/GAPDH protein düzeylerinin normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda anlamlı olarak arttığı ( $p=0,046$ ) görüldü. Ayrıca, hiperoksi (2)+SF grubu ile hiperoksi (2)+NES20 grubu karşılaştırıldığında ATG 5/GAPDH protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ( $p=0,028$ ) tespit edildi. Ancak 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 17 ve şekil 19).



Şekil 19. Beyin ATG5 (ATG5/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,05).

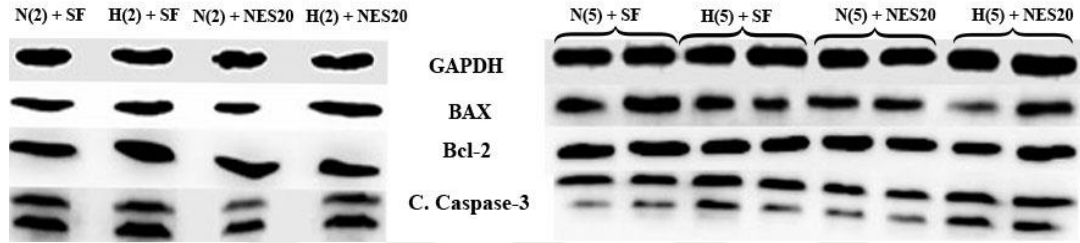
Otofajik hücre ölümü için belirteç olarak kullanılan LC3A-B ekspresyonu değerlendirildiğinde ise; 2 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında beyin LC3A-B/GAPDH protein düzeylerinin normoksi(2)+SF grubuna göre hiperoksi(2)+SF grubunda anlamlı olarak arttığı (p=0,020) görülmüştür. Ayrıca, hiperoksi(2)+SF grubu ile hiperoksi(2)+NES20 grubu karşılaştırıldığında LC3A-B/GAPDH protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı (p=0,024) tespit edildi. Ancak 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 17 ve Şekil 20).



Şekil 20. Beyin LC3A-B (LC3A-B/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,05).

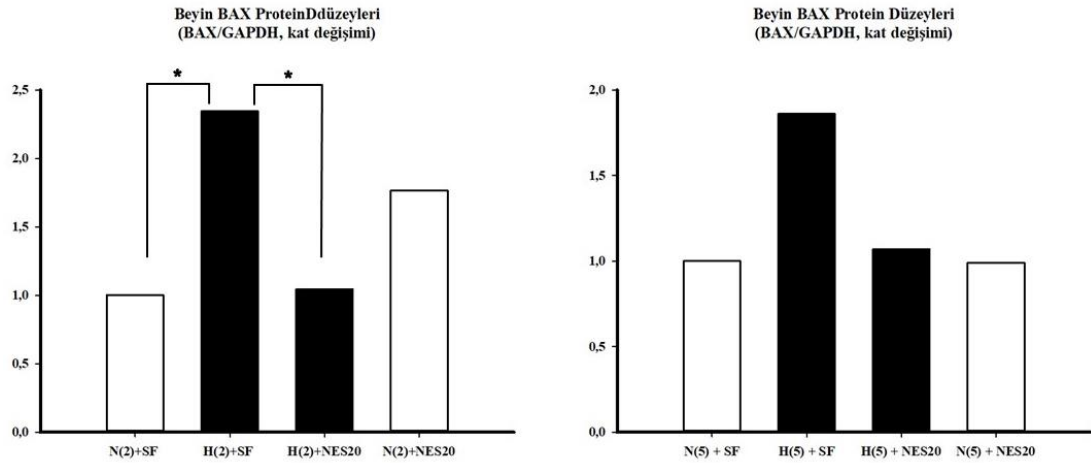
#### 4.4. Nesfatin-1 Peptitinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Apoptoz Üzerine Etkisi

Nesfatin-1'in hiperoksi ile oluşturulmuş yenidoğan sıçan beyin hasarında apoptoz üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, proapoptotik moleküllerden biri olan BAX, anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ve apoptozun hem intrinsik hem de eksintrink yollarının her ikisinde de görev alan cleaved caspase-3 proteinlerinin ekspresyonları western blotting yöntemi ile araştırıldı. Yenidoğan sıçan beyin dokusunda BAX, Bcl-2 ve cleaved caspase-3 (kesilmiş kaspaz-3) protein düzeyleri GAPDH protein düzeyleri ile oranlanarak, protein bantlarının ortalama dansitelerinin kat değeri olarak değerlendirildi (Şekil 21).



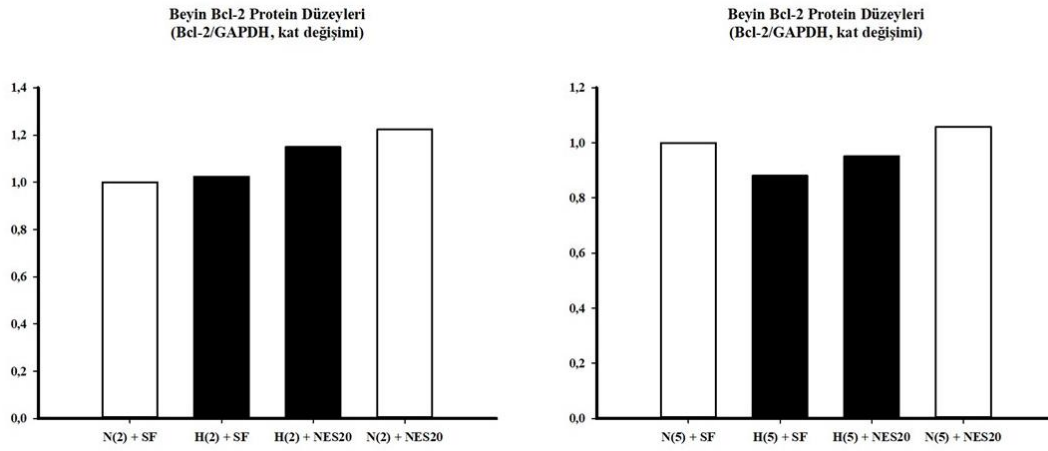
Şekil 21. 2 gün ve 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda apoptoz belirteç protein ekspresyonlarının western blot yöntemi ile protein bantların temsili gösterilmesi.

Pro-apoptotik belirteçlerden biri olan BAX proteinin ekspresyonu western blotting yöntemi ile değerlendirildiğinde, beyin BAX/GAPDH protein düzeylerinin, 2 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında, normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda anlamlı olarak arttığı ( $p=0,039$ ) görülmüştür. Ayrıca hiperoksi (2)+SF grubu ile hiperoksi(2)+NES20 grubu karşılaştırıldığında BAX/GAPDH protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ( $p=0,046$ ) tespit edildi. 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplarda ise arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 22).



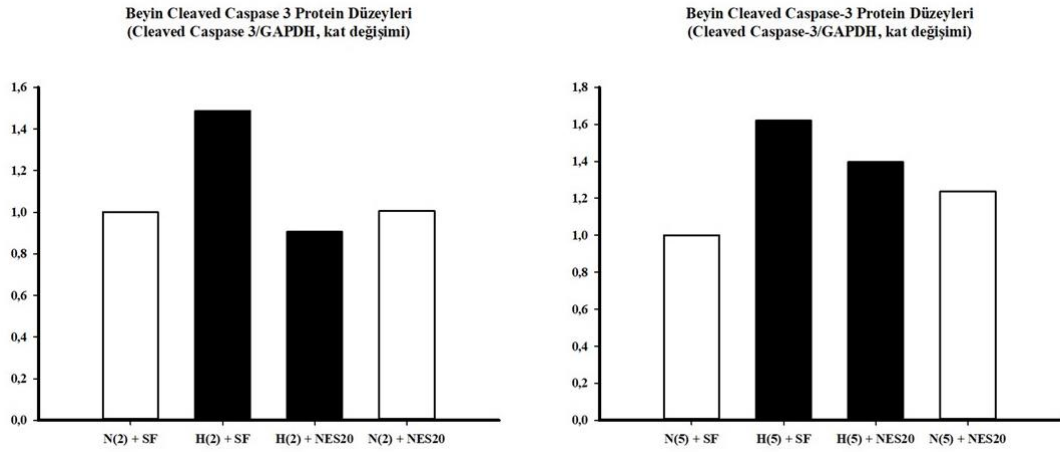
Şekil 22. Beyin BAX (BAX/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması.

İstatiksel karşılaştırmalarda; anti-apoptotik belirteçlerden biri olan Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinde 2 günlük ve 5 günlük hiperoksi ve normoksi grupları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü (Şekil 23).



Şekil 23. Beyin Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması.

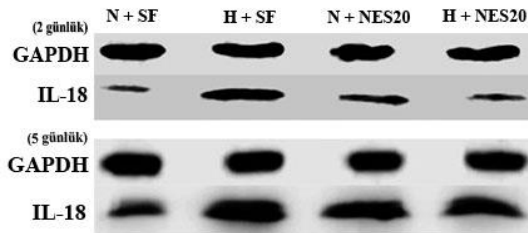
Apoptoz belirteci olan kaspaz-3'ün aktive edilmiş (kesilmiş veya parçalanmış) formunu ifade eden "cleaved caspase-3" proteinin ekspresyonu western blotting yöntemi ile araştırıldığında, beyin kesilmiş kaspaz-3/GAPDH protein düzeylerinin hiperoksi uygulanan gruplarda normoksi gruplarına göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir (Şekil 24).



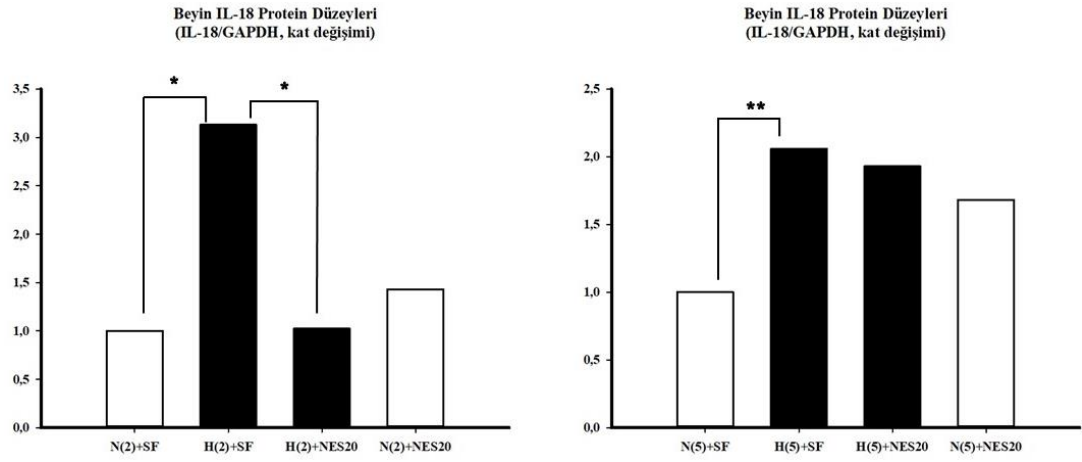
**Şekil 24.** Beyin cleaved-caspase-3 (cleaved-caspase-3/GAPDH, kat değışimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması.

#### 4.5. Nesfatin-1 Peptitinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Nöroenflamasyon Üzerine Etkisi

Nesfatin-1'in hiperoksi ile oluşturulmuş yenidoğan sıçan beyin hasarında enflamasyon üzerine etkisinin gösterilmesi için enflamasyon yanıtı artırdığı bilinen bir sitokin olan IL-18'in protein düzeyleri western blotting yöntemi ile değerlendirildi. 2 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında beyin IL-18/GAPDH protein düzeylerinin normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda anlamlı olarak arttığı ( $p=0,027$ ) görülmüştür. Ayrıca hiperoksi (2)+SF grubu ile hiperoksi (2)+NES20 grubu karşılaştırıldığında IL-18/GAPDH protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ( $p=0,029$ ) tespit edildi. 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında normoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+SF grubu arasında IL-18/GAPDH protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ( $p=0,004$ ) ancak hiperoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+NES20 grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 25 ve Şekil 26).



**Şekil 25.** 2 gün ve 5 gün boyunca uygulama yapılan gruplarda IL-18 protein ekspresyonunun western blot yöntemi ile temsili protein bantlarının gösterilmesi.

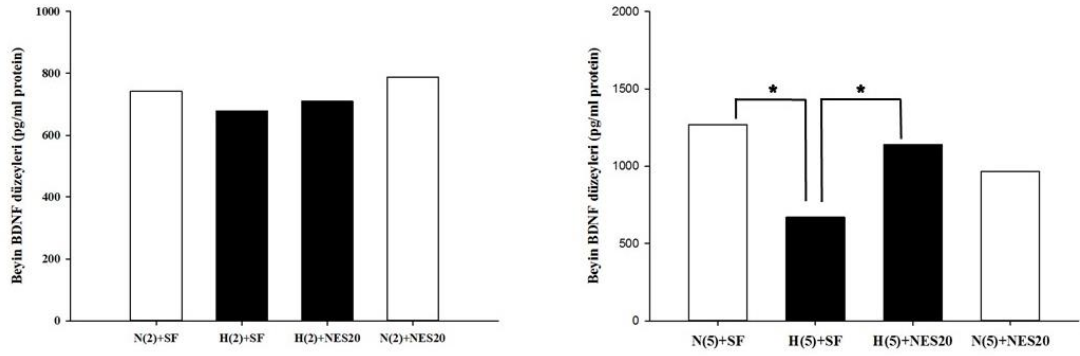


**Şekil 26.** Beyin IL-18 (IL-18/GAPDH, kat değişimi) protein düzeylerinin karşılaştırılması.

#### 4.6. Nesfatin-1 Peptitinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Nörotrofinler Üzerine Etkisi

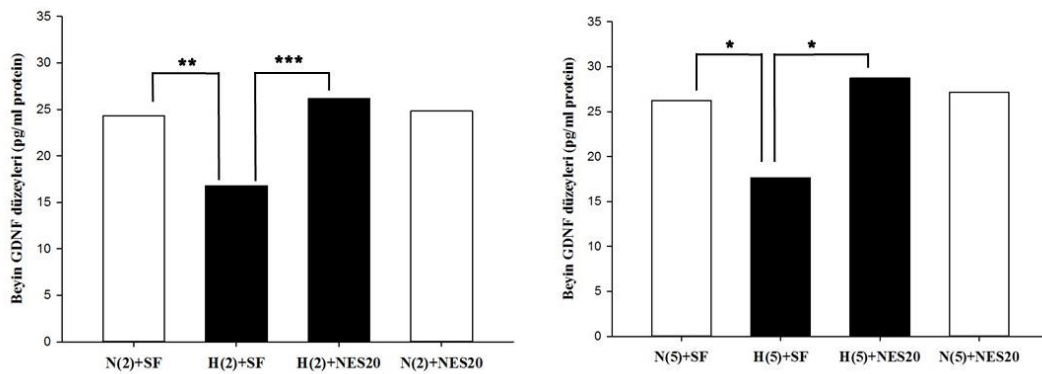
Nesfatin-1'in hiperoksi ile oluşturulmuş yenidoğan sıçan beyin hasarında nörotrofinler üzerine etkisinin gösterilmesi için, nörotrofin ailesinin iki üyesi olan BDNF (brain-derived nerve growth factor) ve GDNF (glial-derived nerve growth factor) protein ekspresyonlarındaki değişiklikler ticari ELISA kitleri kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokollere göre ölçüldü.

Gruplara göre ELİSA ile değerlendirilen beyin BDNF protein düzeyleri normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda azaldığı nesfatin uygulaması ile de BDNF düzeylerinin arttığı görüldü ama bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. 5 günlük gruplarda ise BDNF protein düzeylerinin, normoksi (5)+SF grubuna göre hiperoksi (5)+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı ( $p=0,029$ ) görülmüştür. Ayrıca hiperoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+NES20 grubu karşılaştırıldığında BDNF protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ( $p=0,029$ ) tespit edildi (Şekil 27).



**Şekil 27.** Beyin BDNF protein düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,05).

Gruplara göre ELİSA ile değerlendirilen beyin GDNF protein düzeyleri, normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı (p=0,008), hiperoksi (2)+SF grubu ile hiperoksi (2)+NES20 grubu karşılaştırıldığında GDNF protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı (p=0,001) tespit edildi. Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Tukey testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri p<0,05 olarak kabul edildi. Ayrıca, 5 günlük uygulamalarda GDNF protein düzeylerinin, normoksi (5)+SF grubuna göre hiperoksi (5)+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı (p=0,029) görülmüştür. Ayrıca hiperoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+NES20 grubu karşılaştırıldığında GDNF protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı (p=0,029) görüldü. Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi Kruskal-Wallis ile istatistiki ikili karşılaştırmalar ise Mann-Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri p<0,05 olarak kabul edildi (Şekil 27).

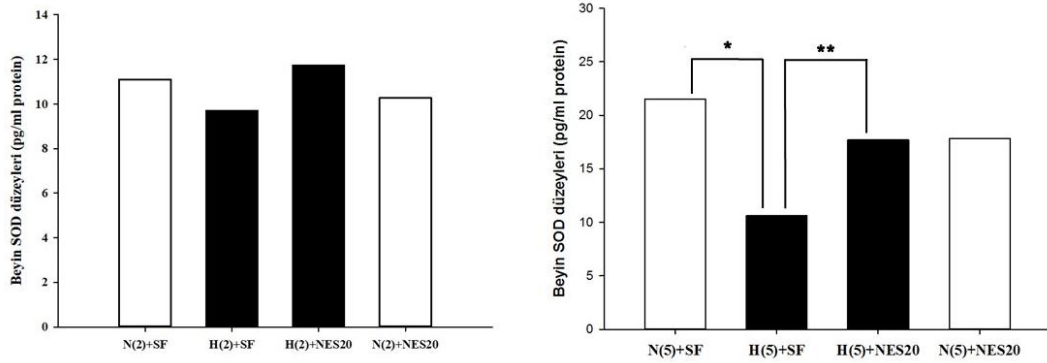


**Şekil 28.** Beyin GDNF protein düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

#### 4.5. Nesfatin-1 Peptitinin Hiperoksi ile İndüklenen Beyin Hasarında Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Nesfatin-1'in hiperoksinin neden olduğu oksidatif stres üzerine etkisinin gösterilmesi için enzimatik antioksidanlardan olan SOD ve GSH-Px enzimlerinin yenidoğan sıçan beyin doku homojenatlarındaki düzeyleri ticari ELISA kitleri kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokollere göre ölçüldü.

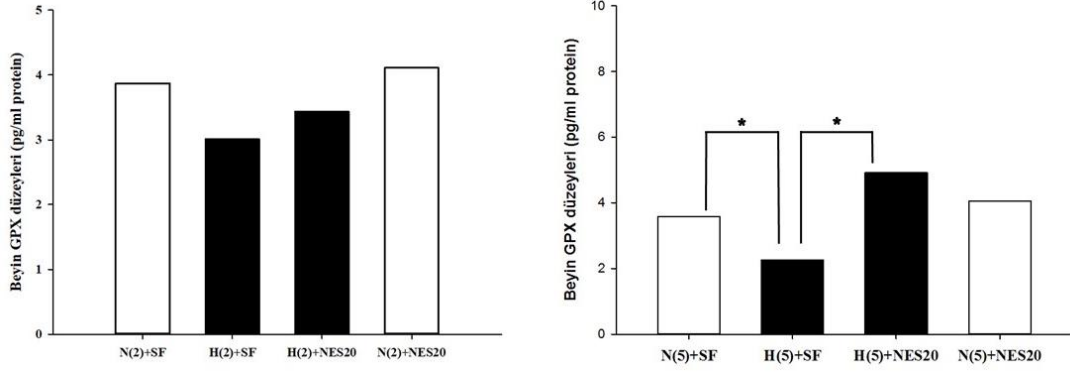
Gruplara göre ELİSA ile değerlendirilen beyin SOD protein düzeyleri normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda azaldığı, nesfatin uygulaması ile de SOD düzeylerinin arttığı görüldü ama bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Beş gün süreyle hiperoksi uygulanan grupların karşılaştırılması sonucunda, hiperoksi uygulamasının, SOD protein düzeylerini normoksi grubuna göre anlamlı olarak azalttığı ( $p=0,016$ ) görüldü. Hiperoksi süresinde 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozunda uygulanan nesfatinin hiperoksi+SF grubuna göre SOD protein düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı ( $p=0,008$ ) tespit edildi (Şekil 29).



Şekil 29. Beyin SOD protein düzeylerinin karşılaştırılması (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

Gruplara göre ELİSA ile değerlendirilen beyin GPX protein düzeyleri normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda azaldığı nesfatin uygulaması ile de GPX düzeylerinin arttığı görüldü ama bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. 5 günlük uygulamalarda ise GPX protein düzeylerinin, normoksi (5)+SF grubuna göre hiperoksi (5)+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı ( $p=0,023$ ) görülmüştür. Ayrıca hiperoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+NES20 grubu

karşılaştırıldığında GPX protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ( $p=0,029$ ) görülmüştür (Şekil 30).



Şekil 30. Beyin GPX protein düzeylerinin karşılaştırılması (\* $p<0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, gelişmekte olan beyinde hiperoksinin indüklediği nöron kaybında gözlenen biyokimyasal, moleküler ve hücrel değişiklikler üzerine nesfatin-1 peptidinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, nesfatin uygulamasının, hiperoksinin neden olduğu nöron kaybını önlediği ve miyelizasyonu koruduğu ışık gösterilmiştir. Ayrıca, hiperoksi ile indüklenen yenidoğan beyin hasarında nesfatin-1 peptidinin koruyucu etkileri, otofaji, apoptoz, nörotrofin ekspresyonu ve oksidatif stres gibi hiperoksinin hasarladığı süreçlere ait bazı parametreler moleküler analiz yöntemleri ile değerlendirilerek literatürde ilk defa gösterilmiştir.

Prematüre doğan bebeklerin yüzdesi son yıllarda gelişmekte olan ülkelerde artmıştır ve tüm canlı doğumların %5,5 ila %11,4'ünü oluşturmaktadır (Reich ve ark., 2017). Prematür bebeklerin hayatta kalma oranı, mevcut tıbbi gelişmelerle giderek artmaktadır. Oksijen tedavisi prematür bebeklerin tedavisinde yaygın bir yöntemdir. Ancak, uzun süreli hiperoksinin neden olduğu aşırı ROS birikimi ve oksidatif stres, büyüme faktörü sinyal iletimini bozarak, başta akciğer ve beyin olmak üzere dokularının gelişimini etkiler (Shrestha, Menon, & Shivanna, 2018). 24 haftalık dünyaya gelen preterm bebeklerin, nöronal migrasyonu tamamlansa da, glial hücre matürasyonu, büyümesi ve sinaps oluşumu hala devam etmektedir (Back, 2006).

Gelişmekte olan beyin, oksidatif strese son derece duyarlıdır, bu da geri dönüşümsüz hasara yol açabilir (Torres-Cuevas ve ark., 2017). Gebeliğin son üç aylık dönemi, sinaptogenez, nöronal migrasyon ve miyelinizasyon gibi çeşitli nöronal ağ aktiviteleri açısından önemli ve hassas olup, nihayetinde nöronal plastisite için önemlidir (Tau & Peterson, 2009). Ayrıca, düşük oksijen içeren rahim içi ortamdan (20-25 mmHg PO<sub>2</sub>) daha yüksek oksijen içeren dış ortama (%100 mmHg PO<sub>2</sub>) geçiş, erken doğan bebeklerde serbest radikallerin oluşumunu tetikler. Dahası, oksijen resüsitasyonu, yardımcı ventilasyon, surfaktan uygulaması, total parenteral beslenme ve kan transfüzyonları gibi müdahaleler, yoğun bakım ortamlarında serbest radikallerin üretimini artırarak oksidatif stresi daha da şiddetlendirir (Lembo, Buonocore, & Perrone, 2021). Bu dönemde, olgunlaşmamış organizma bu stresli durumlara karşı koyamaz, bu nedenle düzenleyici mekanizmalar tam olarak aktive olmaz ve bu genellikle hücrel nöronal süreçlerde kalıcı değişikliklere, aynı zamanda

kardiyovasküler, immünolojik, metabolik ve nöroendokrin yanıtlarda kalıcı hasara yol açar (Lammertink, Vinkers, Tataranno, & Benders, 2021).

Hiperoksi ile indüklenmiş beyin hasarı zaman bağımlı olarak iyi tanımlanmıştır. Felderhoff-Mueser ve ark. (2004) aynı modeli kullandıkları çalışmalarında, 6 günlük sıçanlarda 2, 6, 12, 24 ve 48 saatlik hiperoksi maruziyetinin korteks, hipotalamus, beyaz cevher, striatum ve bazı çekirdeklerde, fizyolojik apoptozun yanı sıra nöronal apoptozunun da yaygın olduğunu (Felderhoff-Mueser ve ark., 2004, 2005) buna karşın, hiperoksinin P14'den sonra dentat girus dışında dejenerasyona neden olmadığı gösterilmiştir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2004).

Hiperoksi, apoptoz ve nekroz şeklinde kortikal, hipokampal ve serebellar nöronal hasara ve dejenerasyona neden olur (Gerstner ve ark., 2008). Suprafizyolojik oksijen tedavisi, artmış inflamasyon, oksidatif stres ve matriks metalloproteinaz aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir ve bunlarla birlikte otofaji, artmış apoptotik hücre ölümü ve azalmış nöro-glial gelişme gibi beyinde değişikliklere neden olur (Brehmer ve ark., 2012; Endesfelder ve ark., 2017b; Sifringer ve ark., 2009; Sifringer ve ark., 2012). Çalışmamızda 6 günlük sıçanlar, insan fetal beyin gelişiminde yaklaşık 28-32. gebelik haftasına denk geldiği için hiperoksi modeli oluşturmak üzere kullanıldı (Dobbing, & Sands, 1979). Devamında sıçan yavruları ekstraterin ortamı taklit etmek amacıyla 2 ve 5 gün boyunca %80 oksijene maruz bırakıldılar.

Son yıllarda literatürde hiperoksi oluşturulan yenidoğan hayvan modellerinde, nöronal hasarı azaltmayı amaçlayan nöroprotektif ajan arayışlarının yoğunlaştığı görülmektedir. Eritropoietin (Bendix ve ark., 2012; Sifringer ve ark., 2010; Sifringer ve ark., 2009), TRP601 (Sifringer ve ark., 2012), deksmedetomidin (Sifringer ve ark., 2015), üridin (Al ve ark., 2020; Goren ve ark., 2017)'in yenidoğan sıçan yavrularında oluşturulan hiperoksik hasarda koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Gören ve ark (2017)'nin hiperoksi modeli oluşturdukları sıçanlarla yaptıkları çalışmada hiperoksik beyin hasarında uygulanan üridin tedavisinin apoptotik hücre ölümünü ve hipomiyelinizasyonu azalttığı, nöron sayısını ve öğrenme ve bellek performansını arttırdığı da bulunmuştur (Goren ve ark., 2017).

Nesfatin-1, 2006 yılında Oh-I ve arkadaşları tarafından keşfedilen bir anoreksijenik nöropeptittir (Oh-I ve ark., 2006). Bu nöropeptit sadece sinir hücrelerinde değil, aynı zamanda mide bezlerinde, duodenumda, pankreas Langerhans adacık hücrelerinde ve deri altı yağ dokusu hücrelerinde de eksprese edilir (Shen ve

ark., 2017). Nesfatin-1'in, kan-beyin bariyerini geçebildiği, bu nedenle nesfatin-1'in periferik bir yol aracılığıyla santral sinir sistemine farmakolojik olarak ulaştırılabileceği gösterilmiştir (Pan, Hsuchou, & Kastin, 2007). Nesfatin peptidinin son zamanlarda yoğun bir şekilde çalışılan nörotoksisite üzerine koruyucu etkileri, anti-apoptoz, anti-enflamasyon ve antioksidan stres ile ilişkili olabilir (Dong, Xie, & Wang, 2019).

Nöronlar oksidatif strese karşı özellikle hassastırlar (Gandhi & Abramov, 2012). Pro- ve antioksidatif dengenin hemostazındaki herhangi bir değişiklik, olgunlaşmamış beyinde hücrel hasara yol açabilir (Forman, Maiorino, & Ursini, 2010). Çalışmamızda 2 ve 5 günlük hiperoksi maruziyeti sonrası korteks nöron sayıları değerlendirilmiştir. 2 günlük hiperoksi uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak korteks nöron sayısı bakımından anlamlı farklılık görülmemiştir. 5 günlük hiperoksi maruziyetinin ise oda atmosferinde tutulan deneklerle karşılaştırıldığında korteks nöron sayısında anlamlı bir şekilde azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 20 µg/kg/gün ve 10 µg/kg/gün dozlarda nesfatin-1 uygulamasının nöron sayısını anlamlı şekilde artırdığı gösterilmiştir. İlginç yanı 20 µg/kg/gün doz nesfatin-1 uygulaması yapılan normoksi grubu deneklerde de korteks nöron sayılarında SF uygulanan gruplara göre anlamlı bir artış görülmüştür.

Nöroenflamasyon ve aşırı ROS, pre-oligodendrosit hücrelerinde hasara ve ölüme neden olarak nihai beyaz cevher kaybına yol açar (Zaghloul ve ark., 2017). Oksijen toksisitesinin önemli bir patolojik sonucu, gelişmekte olan beyinde hipomiyelinizasyonla temsil edilir. Bu fenomen, miyelinlenen pre oligodendrositlerin olgun oligodendrositlere göre oksijen toksisitesine daha duyarlı olmaları nedeniyle özellikle gelişimin erken evrelerinde belirgin olarak ortaya çıkar (Baud ve ark., 2004a; Baud, ve ark., 2004b). Hipomiyelinizasyon, P6'da hiperoksiye maruziyetle deneysel olarak indüklenir ve bu durumda MBP (Myelin basic protein)'nin (Brehmer ve ark., 2012; Hoeber ve ark., 2016; Serdar ve ark., 2016) ekspresyonunda azalma olurken, hiperoksisite P10'da uygulandığında MBP düzeyleri değişmez (Gerstner ve ark., 2008). Hiperoksi, nöronal ve glial hücre ölümüne yol açarak prematüre bebeklerde beyaz ve gri cevherde, beyin hasarına neden olur. Beyin olgunlaşmasının kritik aşamasında, hiperoksi gelişimsel süreçleri değiştirebilir, nöral plastisiteyi ve miyelinleşmeyi bozabilir (Reich ve ark., 2017). Çalışmamızda da sıçan yenidoğan beyin dokusunda miyelinizasyon, korpus kallozum kalınlığının ölçülmesi ile

değerlendirilmiştir. Hem 2 günlük ve hem de 5 günlük hiperoksi uygulanan gruplarda korpus kallozum kalınlıklarının normoksi grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi maruziyeti ile anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Scheuer ve ark (2019)'nın P6 sıçan yavrularıyla gerçekleştirdiği çalışmada 24 saat %80'lik oksijen uygulamasının astrosit sayısını yarı yarıya azalttığı ve beyaz cevher hasarlanması ve serebellar bozulmanın ileri yaşlara kadar devam ettiği bildirilmiştir (Scheuer, Klein, Bühner, Endesfelder, & Schmitz, 2019). Aynı zamanda, Gören ve ark (2017)'nin 0. günden 5. güne kadar hiperoksi uyguladıkları sıçan yavrularıyla yaptıkları çalışmada korpus kallozum kalınlığının hiperoksi ile birlikte azaldığı gösterilmiştir. Bulgularımız bu çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızda 2 ve 5 gün hiperoksi uygulaması sırasında günde tek doz 10 µg/kg ve 20 µg/kg ip enjekte edilen nesfatin-1 peptidinin korpus kallozum kalınlığını hiperoksi+SF gruplarına göre anlamlı olarak artırdığı görülmüştür. Nesfatin-1 uygulamasının miyelizasyonu koruduğu gösterilmiştir.

Hiperoksi maruziyeti Atg proteinlerinin (Atg3, 5, 12, Beklin-1, LC3, LC3A-II ve LC3B-II) ekspresyonlarını değiştirir, bu da otofajinin hiperoksiye bağlı beyin hasarında rol alan patolojik faktörlerden biri olduğunu düşündürür (Bendix ve ark., 2012).

Tanaka ve ark., (2012) 24 saatten 72 saate kadar hiperoksiye maruz bırakılan C57BL/6 farelerde ve Beas-2B (insan bronşiyal epitel hücre hattı) hücrelerinde yaptıkları çalışmada, otofajik protein LC3B'nin ekspresyonunun ve aktivasyonunun indüklendiğini ve otofajik yolun başlatılmasında ayırt edici özellik olan otofagozom oluşumunun uyardığını bildirmişlerdir. Hiperoksiden sonra artan LC3B ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde düzenlenmiş ve c-Jun NH2 terminal kinaz (JNK) sinyal yolunun aktivasyonunu gerektirmiştir. Ayrıca, LC3B'nin siRNA ile yıkılması epitel hücrelerinde hiperoksiye bağlı hücre ölümünü artırırken, LC3B'nin aşırı ekspresyonu hiperoksiden sonra sitoproteksiyon sağlamıştır (Ryter & Choi, 2013). Bendix ve ark (2012) oksijen toksisitesi modelinde, P6 yavrularına 12 saatlik oksijen maruziyetinden sonra Atg3, Atg5, Atg12, LC3A-II ve LC3B-II ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, hiperoksinin olgunlaşmamış beyinde oksidatif stresi tetikleyerek otofaji aktivitesinde erken aşamada bu akut değişiklikleri oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışmada, gruplar arasında 5 günlük gruplarda otofaji marker proteinlerinin ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yoktur. 2 günlük

hiperoksi uygulaması ile beclin-1, Atg5 ve LC3A-B protein ekspresyonları anlamlı olarak artarken nesfatin uygulamasıyla anlamlı olarak azalmıştır. Normoksik koşullar altında nesfatin-1 peptidinin otofaji molekülleri üzerine anlamlı bir etkisi yoktur.

Oksidatif stresin, peroksinitritin toksik etkileri aracılığıyla inflamasyon ve hücre ölümüne neden olabileceğini göstermektedir. Zaten bilinen bir gerçek olan oksidatif stres, fizyolojik apoptozise ek olarak hiperokside nöronal hücre ölümüne önemli ölçüde katkıda bulunan güçlü bir tetikleyicidir. ROS, intrinsik olarak AIF gibi kaspaz bağımsız araçlar ile mitokondriden serbest bırakılan sitokrom c'nin ve ayrıca kaspazların downstream aktivasyonu ile mitokondriya bağımlı apoptozise neden olur. AIF, mitokondrilerden salınan ROS tarafından indüklenir (Fleury, Mignotte, & Vayssiere, 2002).

Zhao ve arkadaşlarının 2017 yılında bağırsak epitel hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada 24 saatlik hiperoksinin Caco-2 hücrelerinde (İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı) apoptozisi anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2017). Puls ve ark. (2023)'ün yaptıkları çalışmada, 24 saat hiperoksiye maruz bıraktıkları 6 günlük (P6) sıçan yavrularının beyincik dokularında cleaved caspase-3 pozitif nöron sayısının anlamlı bir şekilde arttığını ve RNA transkript düzeyinde, artan kaspaz-3 ekspresyonu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da, yenidoğan sıçan beyin homejanatları ile yapılan analizler ile hiperoksi uygulanan gruplarda, apoptotik belirteçlerden BAX ve cleaved caspase-3 protein düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Fakat cleaved caspase-3 protein düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, anti-apoptotik moleküllerden biri olan Bcl-2 protein düzeylerinde de anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Olgunlaşmamış beyinde oksijen nörotoksitesinin çalışıldığı araştırmada 0, 2, 6, 12 süreyle hiperoksiye maruz kalan 6 günlük sıçanların, talamus, korteks ve striatumunda, kaspaz-1 mRNA seviyelerinin maksimum değerine 6 ile 12 saatler arasında ulaştığı 24 saatte ekspresyonun azaldığı görülmektedir (Felderhoff-Mueser et al., 2005). Hiperoksiye maruz kalma süresinin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini çalışan araştırmacılar, %80 oksijen ortamına 2 saat maruz kalmanın, normoksik yavrularla kıyaslandığında önemli apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini bildirmiştir. En şiddetli dejenerasyon ise 12 veya 24 saat süreyle hiperoksik koşullara maruz bırakılan sıçanların beyinlerinde tespit edilmiştir. Daha uzun maruz kalma sürelerinden sonra (48 ve 72 saat), beyinde tespit edilen hücre ölüm miktarının azaldığı

belirlenmiştir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2004). Bizim uyguladığımız 2 ve 5 günlük hiperoksi süresi oldukça uzundur. Sonuçlarımızda istatistiksel olarak anlamlı farklılık çıkmamasının nedeni, büyük ihtimalle bu süreçte apoptotik hücrelerin elimine edilmiş olmasıdır. Alternatif bir açıklama ise, uzun süre boyunca hiperoksiye maruz kalan sıçan yavrularının beyinlerinde oksidatif strese karşı bir tolerans mekanizmasının aktif hale gelmiş olmasıdır.

Tang ve ark. (2012) sıçanlarda travmatik beyin hasarından sonra 10 veya 20 µg/kg nesfatin-1 uygulamasının, apoptotik sinir hücrelerinin sayısını azalttığını ve kaspaz-3 aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca nesfatin-1'in, erken doğum sonrası sıçanlarda etanolün neden olduğu nörotoksisteyi takiben hipokampal apoptotik hücre ölümünü ve GFAP pozitif hücreleri azalttığı gösterilmiştir (Tang ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da nesfatin-1 uygulaması hiperoksiye maruz kalan deneklerde BAX protein düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca cleaved caspase-3 protein düzeylerinde azalmasını sağlamıştır. Ama bu azalma anlamlı olmamıştır.

Oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümüne, artan pro-inflamatuar sitokin seviyeleri eşlik eder. Proinflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-1β çok güçlüdür; bir dizi olayı tetikleyebilir ve diğer sitokinlerin salınımını etkileyebilir. Pro-inflamatuar sitokinlerin yoğun üretimi, çeşitli nöropatolojik durumlarda rol oynayabilir (Sifringer ve ark., 2015). Mikrogliaz ve mikroglial aktivasyon, pro-inflamatuar sitokinleri serbest bırakarak nöroenflamasyonu güçlendirir (Zaghloul ve ark., 2017). Zaghloul ve arkadaşlarının yeni doğan farelerde yaptıkları çalışmada hiperoksinin, IL-1β, IL-6 ve TNF-α, NF-κB gibi pro-enflamatuar sitokinlerin aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Zaghloul ve ark., 2023). Hem IL-1β hem de IL-18'in sinyal iletimi için önemli olan IL-1 reseptörüne bağlı kinaz 4'ten (IRAK-4) yoksun olan fareler, oksijen aracılı nörotoksisteye karşı korunmuştur. Bu nedenle IL-1β ve IL-18'i olgunlaşmamış beyinde hiperoksinin neden olduğu hücre ölümüyle ilişkilendirmektedir (Felderhoff-Mueser ve ark., 2005). Ayrıca, oksijene maruz kalan 6 günlük sıçanların (0, 2, 6, 12, 24 ve 48 saat) hiperoksi ile tetiklenen IL-1β mRNA seviyelerindeki artışı, 2 saatte belirgin olmuş, 6 saatlik oksijen maruziyetinde zirveye ulaşmış ve 24 ve 48. saatlerde bazal seviyelere dönmüştür (Felderhoff-Mueser et al., 2005).

Çeşitli araştırmalar nesfatin-1'in beyindeki enflamasyona karşı koruyucu etkisini göstermiştir. Nesfatin-1 tedavisinin, intrakraniyal hasarlı deneysel sıçan

modellerinde NF- $\kappa$ B ekspresyonunu ve IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi enflamatuar aracılarn konsantrasyonlarını belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir, bu da nesfatin-1'in NF- $\kappa$ B'ye bağı enflamatuar reaksiyonları inhibe edebileceğini güçlü bir şekilde göstermektedir (Tang ve ark., 2012). Ayrıca, nesfatin-1 yardımıyla yapılan tedavi, subaraknoid kanama ile tetiklenen difüzyon ve nötrofitlerin birikmesi ve inflamatuvar aracılarn artan miktarlarını takiben akut ensefalon hasarını önemli ölçüde bastırmıştır (Özsavcı ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da hiperoksiye maruz kalan yenidoğan sıçanların beyin homojenatlarında yapılan western blot analizi ile beyin IL-18/GAPDH protein düzeylerinin hem 2 hemde 5 günlük gruplarda anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Ek olarak nesfatin-1 tedavisinin artan IL-18 seviyelerini azalttığı ve 2 günlük gruplarda bu azalmanın anlamlı olduğu gösterilmiştir.

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre hattı kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), sinir sisteminin büyümesini, farklılaşmasını ve gelişmesini teşvik eden nörotrofin ailesine ait proteinlerdir. Yapılan bir çalışmada, Hiperoksik koşullara maruz kalan farelerde, BDNF ve GDNF mRNA ekspresyonunda farklılıklar ve metillenmiş promotör bölgelerin göreceli düzeylerinde değişikliklerle birlikte DNMT1 ve DNMT3a mRNA ekspresyonunda farklılıklar bildirilmiştir. Hiperoksi sonrası prefrontal kortekste BDNF mRNA ekspresyonunda önemli bir azalma, isokortekste ise önemli bir artış olduğu görülmüştür. Hiperoksi sonrası GDNF mRNA ekspresyonu ise hem isokortekste hem de prefrontal kortekste önemli ölçüde artmıştır (Sengoku ve ark., 2016). Çalışmamızda, BDNF ve GDNF protein düzeyleri ELİSA analizi ile değerlendirildiğinde, BDNF protein miktarının 5 günlük hiperoksinin ardından normoksi grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı ve nesfatin-1 tedavisi ile bu etkinin geriye döndüğü görülmektedir. GDNF protein miktarının ise hem 2 günlük hem de 5 günlük hiperoksi maruziyeti ardından her iki sürede de normoksi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı ve nesfatin-1 tedavisi ile GDNF protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmektedir.

Olgunlaşmamış beyin, yüksek oksijen tüketim hızı, yüksek doymamış yağ asidi konsantrasyonları, düşük antioksidan seviyeleri ve aktivitesi ile büyük miktarda duyarlı olgunlaşmamış hücreye sahip olması nedeniyle ROS'a (hiperoksi tarafından üretilen) karşı son derece savunmasızdır (Collins ve ark., 2001). ROS'un sinir hücrelerindeki zararlı etkisi, antioksidan aktivite ile ilişkilidir. Hücrenel bir antioksidan olan indirgenmiş glutatyon (GSH), ROS'un zararlı etkilerinin azaltılmasında önemli

bir rol oynar. GSH, SOD tarafından süperoksit radikalının katalizi sırasında üretilen hidrojen peroksiti temizler. Mitokondride bulunan GPX adlı bir enzim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya ve lipid peroksitleri, ilgili alkollere GSH'nin GSSG (Glutasyon Disülfit)'e oksidasyonu yoluyla parçalayabilir (Ighodaro, & Akinloye, 2019; Marrocco, Altieri, & Peluso, 2017). Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi (Sifringer ve ark., 2015), 24 saatlik hiperoksi, GSH'nin azalması ve GSSG'nin artmasıyla GSH/GSSG oranının azalmasına neden olur. Bu, glutasyon sisteminin antioksidan kapasitesinin kaybedildiğini ve artan oksidatif stresin doğrulandığını göstermektedir. Hiperoksi sonrası gelişmekte olan beyinde antioksidan kapasitenin azaldığı bilinmektedir (Endesfelder ve ark., 2017a; Endesfelder ve ark., 2017b; Panfoli ve ark., 2018; Torres-Cuevas ve ark., 2017). Epilepsi modeli oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada, antiepileptik ilaç fenitoinin etkilerine benzer şekilde, ip olarak uygulanan nesfatin-1 peptidinin nöbet skorunu azalttığı, antioksidan GSH içeriğini yükselttiği, NO oluşumunu baskıladığı ve nöbet kaynaklı nöronal hasara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Ek olarak, nesfatin-1 ile korteks ve hipokampüste, malondialdehit seviyelerini ve GFAP immünoreaktivitesinin azalttığı ve hafıza disfonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir (Arabacı ve ark., 2022).

Çalışmamızda, glutasyonu kullanarak peroksitleri zararsız hale getiren enzim glutasyon peroksidaz (GPX) protein düzeyleri ELİSA analizi ile değerlendirildiğinde, hiperoksi maruziyeti ile birlikte GPX protein seviyesinin azaldığı ve nesfatin uygulamasıyla GPX protein seviyelerinin arttığı görülmüştür. 2 günlük gruplarda bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmasada 5 günlük hiperoksi maruziyeti ile birlikte GPX seviyesinin hiperoksi (5)+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı ve hiperoksi (5)+SF ile hiperoksi (5)+NES20 grubu karşılaştırıldığında nesfatin uygulamasının GPX protein düzeyini anlamlı bir şekilde artırdığı görülmüştür.

SOD, hücresel sistemdeki en önemli detoksifikasyon ve antioksidan enzimlerden biridir. (Ighodaro, & Akinloye, 2019). Sitoplazmik bakır-çinko süperoksit dismutaz (SOD1) ve mitokondriyal mangan süperoksit dismutaz (SOD2), süperoksit radikallerinin hücresel konsantrasyonunu fizyolojik olarak düşük tutar. Bu önemli enzimler, süperoksit radikallerinin oksijen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşmesini sağlar (Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy, & Malik, 2014). SOD ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi pro-oksidan ürünlerin oluşumuna yol açtığı için, CAT (katalaz) ve GPX gibi diğer antioksidan enzimlere ihtiyaç duyulur (Ighodaro, & Akinloye, 2019). CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye

dönüştüren bir antioksidan enzimdir (Vives-Bauza Starkov, & Garcia-Arumi, 2007) ve SOD tarafından başlatılan detoksifikasyon sürecini tamamlar (Ighodaro, & Akinloye, 2019).

Çalışmamızda, beyin SOD protein düzeyleri normoksi (2)+SF grubuna göre hiperoksi (2)+SF grubunda azaldığı nesfatin uygulaması ile de SOD düzeylerinin arttığı görülmüştür ama bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. 5 günlük gruplarda ise SOD protein düzeylerinin, normoksi (5)+SF grubuna göre hiperoksi (5)+SF grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca hiperoksi (5)+SF grubu ile hiperoksi (5)+NES20 grubu karşılaştırıldığında SOD protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmada gelişmekte olan beyinde hiperoksi ile indüklenmiş beyin hasarında nesfatin-1 peptidinin etkisi araştırılmıştır. İntraperitoneal olarak verilen nesfatin-1 peptidinin hiperoksinin neden olduğu beyin hasarını azalttığı ve bu etkisini hiperoksik koşullarda bozulan hücresel ve moleküler mekanizmalardan bazılarını iyileştirerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu sonuç, nesfatin-1 peptidinin nöroprotektif bir ajan olabileceğini göstermektedir ve literatüre yeni bilgiler sağlamaktadır. İlerleyen çalışmalarda hiperoksik hasarın önlenmesi ve/veya tedavi edilmesine yönelik klinikle bağlantılı yeni projelerin üretilmesine temel oluşturabilme potansiyeline sahiptir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J. B., De Smedt, H., & Bultynck, G. (2014). A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2240–2252. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.04.017>
- Al, N., Çakir, A., Koç, C., Cansev, M. & Alkan, T. (2020). Antioxidative effects of uridine in a neonatal rat model of hyperoxic brain injury. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(8), 2059–2066. <https://doi.org/10.3906/sag-2002-14>.
- Ali, A., Zambrano, R., Duncan, M. R., Chen, S., Luo, S., Yuan, H., ..., Wu, S. (2021). Hyperoxia-activated circulating extracellular vesicles induce lung and brain injury in neonatal rats. *Scientific Reports*, 11(1), 20229. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87706-w>
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117(2), 145-52. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3)
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00005-8)
- Anding, A.L & Baehrecke, E.H. (2015). Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*, 114, 67–91. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2015.07.012>
- Angelone, T., Filice, E., Pasqua, T., Amodio, N., Galluccio, M., Montesanti, G., ..., Cerra, M. C. (2013). Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: Identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (3), 495-509. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1138-7>
- Arabacı Tamer, S., Koyuncuoğlu, T., Karagöz Köroğlu, A., Akakın, D., Yüksel, M., & Yeğen, B. (2022). Nesfatin-1 ameliorates oxidative brain damage and memory impairment in rats induced with a single acute epileptic seizure. *Life Sciences*, 294, 120376. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120376>
- Atsuchi, K., Asakawa, A., Ushikai, M., Ataka, K., Tsai, M., Koyama, K., ..., Inui, A. (2010). Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport*, 21(15), 1008-11. <https://doi.org/10.1097/WNR.0B013E32833F7B96>
- Babikian, T., Prins, M.L., Cai, Y., Barkhoudarian, G., Hartonian, I., Hovda, D.A., & Giza, C. C. (2011). Molecular and physiological responses to juvenile traumatic brain injury: Focus on growth and metabolism. *Developmental Neuroscience*, 32(5-6), 431-41. <https://doi.org/10.1159/000320667>
- Back, S. A. (2006). Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 12(2), 129–140. <https://doi.org/10.1002/MRDD.20107>
- Baud, O., Haynes, R.F., Wang, sH., Folkerth, R.D., Li, J., Volpe, J.J., & Rosenberg, P.A. (2004a). Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *European Journal of Neuroscience*, 20(1), 29–40. <https://doi.org/10.1111/J.0953-816X.2004.03451.X>

- Baud, O., Li, J., Zhang, Y., Neve, R.L., Volpe, J.J., & Rosenberg, P.A. (2004b). Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *European Journal of Neuroscience*, 20(7), 1713–1726. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2004.03616.X>
- Bendix, I., Schulze, C., von Haefen, C., Gellhaus, A., Endesfelder, S., Heumann, R., ... Siffringer, M. (2012). Erythropoietin Modulates Autophagy Signaling in the Developing Rat Brain in an In Vivo Model of Oxygen-Toxicity. *International Journal of Molecular Science*, 13, 12939–12951. <https://doi.org/10.3390/ijms131012939>
- Bibel, M., & Barde, Y.-A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*, 14(23), 2919–2937. <https://doi.org/10.1101/gad.841400>
- Bockhorst, K.H., Narayana, P.A., Liu, R., Ahobila-Vijjula, P., Ramu, J., Kamel, M., Wosik, J., ... Perez-Polo, J. R. (2008). Early postnatal development of rat brain: In vivo diffusion tensor imaging. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7). <https://doi.org/10.1002/jnr.21607>
- Bonnet, M. S., Djelloul, M., Tillement, V., Tardivel, C., Mounien, L., Trouslard, J., ... Dallaporta, M. (2013). Central NUCB2/Nesfatin-1-Expressing Neurons Belong to the Hypothalamic-Brainstem Circuitry Activated by Hypoglycaemia. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02375.x>
- Bonnet, M. S., Pecchi, E., Trouslard, J., Jean, A., Dallaporta, M., & Troadec, J. D. (2009). Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *Journal of Neuroinflammation*, 6, 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-27>
- Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Brailoiu, E., Inan, S., Yang, J., Jaw, K. C., & Dun, N. J. (2007). Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, 148(10), 5088–5094. <https://doi.org/10.1210/EN.2007-0701>
- Brehmer, F., Bendix, I., Prager, S., van de Looij, Y., Reinboth, B. S., Zimmermanns, J., ... Gerstner, B. (2012). Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *Plos One*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049023>
- Cansev, M., Minbay, Z., Goren, B., Yaylagul, E. O., Cetinkaya, M., Koksall, N., & Alkan, T. (2013). Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neuroscience Letters*, 542, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.035>
- Claus, C.P., Tsuru-Aoyagi, K., Adwanikar, H., Walker, B., Whetstone, W., & Noble-Haesslein, L. J. (2010). Age Is a Determinant of Leukocyte Infiltration and Loss of Cortical Volume after Traumatic Brain Injury. *Developmental Neuroscience*, 32(5–6), 454–465. <https://doi.org/10.1159/000316805>
- Chabi, B., Ljubicic, V., Menzies, K. J., Huang, J. H., Saleem, A., & Hood, D. A. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 7(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2007.00347.X>
- Collins, M. P., Lorenz, J. M., Jetton, J. R., & Paneth, N. (2001). Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants.

- Pediatric Research*, 50(6), 712–719. <https://doi.org/10.1203/00006450-200112000-00014>
- Cornford, E. M., & Cornford, M. E. (1986). Nutrient transport and the blood-brain barrier in developing animals. *Federation Proceedings*, 45(7), 2065-72.
- Cowan, F., Rutherford, M., Groenendaal, F., Eken, P., Mercuri, E., Bydder, G. M., ... De Vries, L. S. (2003). Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. *Lancet*, 361(9359), 736-42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12658-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12658-X)
- Craig, A., Luo, N. L., Beardsley, D. J., Wingate-Pearse, N., Walker, D. W., Hohimer, A. R., & Back, S. A. (2003). Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Experimental Neurology*, 181(2), 231-40. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00032-3)
- Crain, B., Cotman, C., Taylor, D., & Lynch, G. (1973). A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Research*, 63, 195-204. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90088-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90088-7)
- Dağdeviren, T. (2021). Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120–135. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gutfd/issue/67960/1053978>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562-6. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Dapaah-Siakwan, F., Zambrano, R., Luo, S., Duncan, M. R., Kerr, N., Donda, K., ... Wu, S. (2019). Caspase-1 inhibition attenuates hyperoxia-induced lung and brain injury in neonatal mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 61(3), 341-354. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0192OC>
- Davies, K. (2001). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5):279-89. <https://doi.org/10.1080/713803728>
- Day, C. L., & Ryan, R. M. (2017). Bronchopulmonary dysplasia: New becomes old again! *Pediatric Research* 81(1–2), 210-213. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.201>
- Deuber, C., & Terhaar, M. (2011). Hyperoxia in Very Preterm Infants. *Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*, 15(4), 223-9. <https://doi.org/10.1097/jpn.0b013e318226ee2c>
- Diamond, A. (1990). Rate of maturation of the hippocampus and the developmental progression of children's performance on the delayed non-matching to sample and visual paired comparison tasks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 608, 394-426; discussion 426-33 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb48904.x>
- Dinan, T. G., & Dinan, T. (2009). Inflammatory markers in depression. *Current Opinion in Psychiatry*, 22(1), 32–36. <https://doi.org/10.1097/YCO.0B013E328315A561>
- Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3(1), 79–83. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90022-7).

- Dong, D., Xie, J., & Wang, J. (2019). Neuroprotective Effects of Brain-Gut Peptides: A Potential Therapy for Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 35(6), 1085–1096. <https://doi.org/10.1007/S12264-019-00407-3/FIGURES/1>
- Dong, J., Guan, H. Z., Jiang, Z. Y., & Chen, X. (2014). Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the dorsal vagal complex and inhibits food intake. *Plos One*, 9(6), e98967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098967>
- Dore, R., Levata, L., Gachkar, S., Jöhren, O., Mittag, J., Lehnert, H., & Schulz, C. (2017a). The thermogenic effect of nesfatin-1 requires recruitment of the melanocortin system. *Journal of Endocrinology*, 235(2), 111-122.. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0151>
- Dore, R., Levata, L., Lehnert, H., & Schulz, C. (2017b). Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *Journal of Endocrinology*, 232(1), R45–R65. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0361>
- D'Sa, C., & Duman, R. S. (2002). Antidepressants and neuroplasticity. *ka*, 4(3), 183–194. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2002.01203.x>
- Dzietko, M., Boos, V., Siffringer, M., Polley, O., Gerstner, B., Genz, K., ... Felderhoff-Mueser, U. (2008). A Critical Role for Fas/CD-95 Dependent Signaling Pathways in the Pathogenesis of Hyperoxia-Induced Brain Injury. *Annals of Neurology*, 64, 664–673. <https://doi.org/10.1002/ana.21516>
- Endesfelder, S., Makki, H., Von Haefen, C., Spies, C. D., Bühner, C., & Siffringer, M. (2017a). Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain. *Plos One*, 12(2), e0171498. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0171498>
- Endesfelder, S., Weichelt, U., Strauß, E., Schlör, A., Siffringer, M., Scheuer, T., ... Schmitz, T. (2017b). Neuroprotection by caffeine in hyperoxia-induced neonatal brain injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 187. <https://doi.org/10.3390/ijms18010187>
- Engelhardt, B. (2003). Development of the blood-brain barrier. *Cell and Tissue Research*, 314(1), 119-29. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0751-z>
- Erfani, S., Moghimi, A., Aboutaleb, N., & Khaksari, M. (2019). Protective effects of Nesfatin-1 peptide on cerebral ischemia reperfusion injury via inhibition of neuronal cell death and enhancement of antioxidant defenses. *Metabolic Brain Disease*, 34(1), 79-85. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0323-2>
- Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Siffringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L.,..., Ikonomidou, C. (2004). Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of Disease*, 17(2), 273–282. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2004.07.019>
- Felderhoff-Mueser, U., Siffringer, M., Polley, O., Dzietko, M., Leineweber, B., Mahler, L., ... Bühner, C. (2005). Caspase-1-Processed Interleukins in Hyperoxia-Induced Cell Death in the Developing Brain. *Annals of Neurology*, 57, 50–59. <https://doi.org/10.1002/ana.20322>
- Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2–3), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01369-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01369-X)
- Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 49(5), 835–842. <https://doi.org/10.1021/BI9020378>

- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2004). Apoptosis Signaling in Tumor Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028(1), 150–156. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1322.016>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- Gao, S., Guo, F., Sun, X., Zhang, N., Gong, Y., & Xu, L. (2017). The inhibitory effects of nesfatin-1 in ventromedial hypothalamus on gastric function and its regulation by nucleus accumbens. *Frontiers in Physiology*, 7, 634. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00634>
- García-Galiano, D., Pineda, R., Ilhan, T., Castellano, J. M., Ruiz-Pino, F., Sánchez-Garrido, M. A.,... Tena-Sempere, M. (2012). Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology*, 153(4), 1959–71. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2032>
- Ganguly, R., & Pierce, G. N. (2015). The toxicity of dietary trans fats. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 170–176. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.02.004>
- Ge, J. F., Xu, Y. Y., Qin, G., Pan, X. Y., Cheng, J. Q., & Chen, F. H. (2015). Nesfatin-1, a potent anorexic agent, decreases exploration and induces anxiety-like behavior in rats without altering learning or memory. *Brain Research*, 1629, 171–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.027>
- Gerstner, B., DeSilva, T. M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R. L.,... Rosenberg, P. A. (2008). Hyperoxia Causes Maturation-Dependent Cell Death in the Developing White Matter. *Journal of Neuroscience*, 28(5), 1236–1245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-07.2008>
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 722–728. <https://doi.org/10.1038/NRM2240>
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 178–194. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.55.3.178>
- Goebel-Stengel, M., & Wang, L. (2013). Central and peripheral expression and distribution of NUCB2/nesfatin-1. *Current Pharmaceutical Design*, 19(39), 6935–6940. <https://doi.org/10.2174/138161281939131127124814>
- Goren, B., Cakir, A., Sevinc, C., Serter Kocoglu, S., Ocalan, B., Oy, C., ... Cansev, M. (2017). Uridine treatment protects against neonatal brain damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Research*, 1676, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.09.010>
- Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2007). Autophagy and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78, 217–245. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)78006-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)78006-1)
- Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., & Colombo, M. I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian

- cells. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2687–2697. <https://doi.org/10.1242/JCS.01114>
- Hagberg, H., Ichord, R., Palmer, C., Yager, J. Y., & Vannucci, S. J. (2002). Animal models of developmental brain injury: Relevance to human disease - A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on developmental cerebral blood flow and metabolism. *Developmental Neuroscience*, 24(5), 364-6. <https://doi.org/10.1159/000069040>
- Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S. J., & Kenyon, C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6(1), 95–110. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00267.X>
- Hars, E. S., Qi, H., Ryazanov, A. G., Jin, S., Cai, L., Hu, C., & Liu, L. F. (2006). Autophagy Regulates Ageing in *C. elegans*. *Autophagy*, 3(2), 93-5. <https://doi.org/10.4161/AUTO.3636>
- Hoeber, D., Sifringer, M., Van De Looij, Y., Herz, J., Sizonenko, S. V., Kempe, K., ... Bendix, I. (2016). Erythropoietin Restores Long-Term Neurocognitive Function Involving Mechanisms of Neuronal Plasticity in a Model of Hyperoxia-Induced Preterm Brain Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9247493. <https://doi.org/10.1155/2016/9247493>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 411-2. (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 677-736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huppertz, B., Frank, H. G., & Kaufmann, P. (1999). The apoptosis cascade - Morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, 200(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S004290050254/METRICS>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2019). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.4314/bafm.v54i4>.
- Ikonomidou, C., & Kaindl, A. M. (2011). Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxidants and Redox Signaling* 14(8),1535-50. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3581>
- Ishida, E., Hashimoto, K., Shimizu, H., Okada, S., Satoh, T., Kato, I., ... Mori, M. (2012). Nesfatin-1 Induces the Phosphorylation Levels of cAMP Response Element-Binding Protein for Intracellular Signaling in a Neural Cell Line. *Plos One*, 7(12), e50918. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050918>
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5360-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-01-0080>
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E. L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, 117(20), 4837–4848. <https://doi.org/10.1242/JCS.01370>
- Jensen, A., Garnier, Y., Middelanis, J., & Berger, R. (2003). Perinatal brain damage - From pathophysiology to prevention. *European Journal of Obstetrics and*

- Gynecology and Reproductive Biology*, 110, Suppl 1:S70-9.  
[https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(03\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(03)00175-1)
- Ji, H. H., Sang, W. H., & Seung, K. L. (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(1), 51-70.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.035>
- Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296.  
<https://doi.org/10.4161/AUTO.7.3.14487>
- Juhász, G., Hill, J. H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E. H., Backer, J. M., & Neufeld, T. P. (2008). The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 181(4), 655-666.  
<https://doi.org/10.1083/JCB.200712051>
- Jungner, Å., Vallius Kvist, S., Romantsik, O., Bruschetini, M., Ekström, C., Bendix, I., ... Ley, D. (2019). White Matter Brain Development after Exposure to Circulating Cell-Free Hemoglobin and Hyperoxia in a Rat Pup Model. *Research Article Developmental Neuroscience*, 41, 234-246.  
<https://doi.org/10.1159/000505206>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., ... Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720-5728.  
<https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.21.5720>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 13), 2805-12.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., & Aubry, J.-M. (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research*, 109(2), 143-148.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(02\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(02)00005-7)
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.  
<https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>
- Kochanek, P. M. (1993). Ischemic and traumatic brain injury. *Critical Care Medicine*, 21(Supplement), S333-S334.  
<https://doi.org/10.1097/00003246-199309001-00016>
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*, 495(1-2), 12-15.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02316-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02316-X)
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149-84.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-689. doi: 10.1038/227680a0
- Lammertink, F., Vinkers, C. H., Tataranno, M. L., & Benders, M. J. N. L. (2021). Premature Birth and Developmental Programming: Mechanisms of Resilience and Vulnerability. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 531571.  
<https://doi.org/10.3389/FPSYT.2020.531571>
- Legg-St Pierre, C. B., Mackova, M., Miskiewicz, E. I., Hemmings, D. G., Unniappan, S., & Macphee, D. J. (2018). Insulinotropic nucleobindin-2/nesfatin-1 is

- dynamically expressed in the haemochorial mouse and human placenta. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(3), 519-532. <https://doi.org/10.1071/RD16486>
- Lembo, C., Buonocore, G., & Perrone, S. (2021). Oxidative Stress in Preterm Newborns. *Antioxidants*, 10(11), 1672. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10111672>
- Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., ... Jung, J. U. (2008). Beklin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, 10(7), 776–787. <https://doi.org/10.1038/NCB1740>
- Li, C., Zhang, F., Shi, L., Zhang, H., Tian, Z., Xie, J., & Jiang, H. (2014). Nesfatin-1 decreases excitability of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(3), 419–424. <https://doi.org/10.1007/S12031-013-0169-3>
- Loreto, C., Rapisarda, V., Carnazza, M. L., Musumeci, G., D'Agata, V., Valentino, M., & Martinez, G. (2007). Bitumen products alter bax, bcl-2 and cytokeratin expression: An in vivo study of chronically exposed road pavers. *Journal of Cutaneous Pathology*, 34(9), 699–704. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0560.2006.00687.X>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.j. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275
- Maejima, Y., Sedbazar, U., Suyama, S., Kohno, D., Onaka, T., Takano, E., Yoshida, N., Koike, M., Uchiyama, Y., Fujiwara, K., Yashiro, T., Horvath, T. L., Dietrich, M. O., Tanaka, S., Dezaki, K., Hashimoto, K., Shimizu, H., Nakata, M., Mori, M., & Yada, T. (2009). Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metabolism*, 10(5), 355–365. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.09.002>
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., & Yancopoulos, G. D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 5(4), 501–509. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90089-Dx](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90089-Dx)
- Maria Fimia, G., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., ... Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), 1121-5. <https://doi.org/10.1038/nature05925>
- Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 6501046. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>
- Marshall, C. A. G., Suzuki, S. O., & Goldman, J. E. (2003). Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: Who are they, where did they come from, and where are they going? *GLIA*, 43(1), 52-61. <https://doi.org/10.1002/glia.10213>
- Meléndez, A., & Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–26. <https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.147.1>

- Merali, Z., Cayer, C., Kent, P., & Anisman, H. (2008). Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology*, 201(1), 115-23. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1252-2>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5149>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008 451:7182, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Murray, D. M., Spagnoli, C., Nuova, S. M., Upadhya, D., Bendix, I., Dewan, M. V., ... Felderhoff-Müser, U. (2020). Repetitive Erythropoietin Treatment Improves Long-Term Neurocognitive Outcome by Attenuating Hyperoxia-Induced Hypomyelination in the Developing Brain. *Frontiers in Neurology*, 1, 804. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00804>
- Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Trovato, F. M., Weinberg, A. M., Al-Wasiyah, M. K., Alqahtani, M. H., & Mobasher, A. (2015). Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, Vol. 16, Pages 20560-20575, 16(9), 20560–20575. <https://doi.org/10.3390/IJMS160920560>
- Obst, S., Herz, J., Alejandre Alcazar, M. A., Endesfelder, S., Möbius, M. A., Rüdiger, M., ... Bendix, I. (2022). Perinatal Hyperoxia and Developmental Consequences on the Lung-Brain Axis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 578414. <https://doi.org/10.1155/2022/5784146>
- Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., ... Mori, M. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112), 709–712. <https://doi.org/10.1038/NATURE05162>
- O'Reilly, S. A., Roedica, J., Nagy, D., Hallewell, R. A., Alderson, K., Marklund, S. L., Kuby, J., & Kushner, P. D. (1995). Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 131(2), 203–210. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90042-X)
- Ozcan, M., Gok, Z. B., Kacar, E., Serhatlioglu, I., & Kelestimur, H. (2016). Nesfatin-1 increases intracellular calcium concentration by protein kinase C activation in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters*, 619, 177–181. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2016.03.018>
- Özsavcı, D., Erşahin, M., Şener, A., Özakpınar, Ö. B., Toklu, H. Z., Akakın, D., ... Yeğen, B. Ç. (2011). The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery*, 68(6), 1699–1708. <https://doi.org/10.1227/NEU.0B013E318210F258>
- Panfoli, I., Candiano, G., Malova, M., De Angelis, L., Cardiello, V., Buonocore, G., & Ramenghi, L. A. (2018). Oxidative stress as a primary risk factor for brain damage in preterm newborns. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 417611. <https://doi.org/10.3389/FPED.2018.00369/BIBTEX>
- Pan, W., Hsuchou, H., & Kastin, A. J. (2007). Nesfatin-1 crosses the blood–brain barrier without saturation. *Peptides*, 28(11), 2223–2228. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2007.09.005>
- Parinandi, N. L., Kleinberg, M. A., Usatyuk, P. V., Cummings, R. J., Pennathur, A., Cardounel, A. J., ... Natarajan, V. (2003). Hyperoxia-induced NAD(P)H

- oxidase activation and regulation by map kinases in human lung endothelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(1), L26–L38. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00123.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H50131166013.JPEG>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Paxinos G., & Watson C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- Peter R., H. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - Developmental changes and effects of aging. *Brain Research*, 163(2), 195-205. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90349-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90349-4)
- Price, T. O., Samson, W. K., Niehoff, M. L., & Banks, W. A. (2007). Permeability of the blood–brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*, 28(12), 2372–2381. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2007.10.008>
- Price, C. J., Samson, W. K., & Ferguson, A. V. (2008). Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Research*, 1230, 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.06.084>
- Prins, M. L., & Hovda, D. A. (1998). Traumatic brain injury in the developing rat: Effects of maturation on Morris water maze acquisition. *Journal of Neurotrauma*, 15(10), 799-811. <https://doi.org/10.1089/neu.1998.15.799>
- Prinz, P., Goebel-Stengel, M., Teuffel, P., Rose, M., Klapp, B. F., & Stengel, A. (2016). Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(3), 521–527. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.01.113>
- Puls, R., von Haefen, C., Bühner, C., & Endesfelder, S. (2023). Dexmedetomidine Protects Cerebellar Neurons against Hyperoxia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in the Juvenile Rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS24097804>
- Rakic, P., & Nowakowski, R. S. (1981). The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 196(1), 99-128. <https://doi.org/10.1002/cne.901960109>
- Raison, C. L., Borisov, A. S., Majer, M., Drake, D. F., Pagnoni, G., Woolwine, B. J., Vogt, G. J...., & Miller, A. H. (2009). Activation of Central Nervous System Inflammatory Pathways by Interferon-Alpha: Relationship to Monoamines and Depression. *Biological Psychiatry*, 65(4), 296–303. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.08.010>
- Reich, B., Hoerber, D., Bendix, I., & Felderhoff-Mueser, U. (2017). Hyperoxia and the immature brain. *Developmental Neuroscience*, 38(5):311-330. <https://doi.org/10.1159/000454917>
- Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108(Suppl.3), 511-33. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
- Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2013). Regulation of Autophagy in Oxygen-Dependent Cellular Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 19(15), 2747–2756. <https://doi.org/10.2174/1381612811319150010>

- Sanità, P., Capulli, M., Teti, A., Paradiso Galatioto, G., Vicentini, C., Chiarugi, P., ... Angelucci, A. (2014). Tumor-stroma metabolic relationship based on lactate shuttle can sustain prostate cancer progression. *BMC Cancer*, *14*, 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-154>
- Saunders, N. R., Liddelow, S. A., & Dziegielewska, K. M. (2012). Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 46. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00046>
- Scheuer, T., Klein, L. S., Bühner, C., Endesfelder, S., & Schmitz, T. (2019). Transient Improvement of Cerebellar Oligodendroglial Development in a Neonatal Hyperoxia Model by PDGFA. *Treatment. Developmental Neurobiology*, *79*(3), 222–235. <https://doi.org/10.1002/DNEU.22667>
- Schmitz, T., Krabbe, G., Weikert, G., Scheuer, T., Matheus, F., Wang, Y., ... Endesfelder, S. (2014). Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Experimental Neurology*, *254*, 153–65. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.017>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haesslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *106–107*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.001>
- Sengoku, T., Murray, K. M., & Wilson, M. E. (2016). Neonatal hyperoxia induces alterations in neurotrophin gene expression; Neonatal hyperoxia induces alterations in neurotrophin gene expression. *International. Journal of Developmental Neuroscience*, *48*, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.11.003>
- Serdar, M., Herz, J., Kempe, K., Lumpe, K., Reinboth, B. S., Sizonenko, ... Bendix, I. (2016). Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain, Behavior, and Immunity*, *52*, 106–119. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2015.10.004>
- Shen, X. L., Song, N., Du, X. X., Li, Y., Xie, J. X., & Jiang, H. (2017). Nesfatin-1 protects dopaminergic neurons against MPP+/MPTP-induced neurotoxicity through the C-Raf–ERK1/2-dependent anti-apoptotic pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep40961>
- Shim, S. Y., & Kim, H. S. (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean Journal of Pediatrics*, *56*(3), 107–111. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.3.107>
- Shrestha, A. K., Menon, R. T., & Shivanna, B. (2018). Leflunomide attenuates oxidative stress in fetal human lung endothelial cells via superoxide dismutase 2 and catalase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(3), 2009–2014. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.07.149>
- Siffringer, M., Bendix, I., Bö Rner, C., Endesfelder, S., von Haefen, C., Kalb, A., ... Felderhoff-Mueser, U. (2012). Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death and Disease*, *3*(1), e250. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.133>
- Siffringer, M., Brait, D., Weichelt, U., Zimmerman, G., Endesfelder, S., Brehmer, F., ... Felderhoff-Mueser, U. (2010). Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(5), 792–799. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2009.08.010>

- Sifringer, M., Genz, K., Brait, D., Brehmer, F., Löber, R., Weichelt, U., ...Felderhoff-Mueser, U. (2009). Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Developmental Neuroscience*, 31(5), 394-402. <https://doi.org/10.1159/000232557>
- Sifringer, M., von Haefen, C., Krain, M., Paeschke, N., Bendix, I., Bühner, C., ... Endesfelder, S. (2015). Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 53037. <https://doi.org/10.1155/2015/530371>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology Review*, 20(4),327-48. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 244–250. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.03.009>
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., Sato, Y., ... Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beklin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1142-51. <https://doi.org/10.1038/ncb1634>
- Tanaka, A., Jin, Y., Lee, S. J., Zhang, M., Kim, H. P., Stolz, D. B., ... Choi, A. M. K. (2012). Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(4), 507-14. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2009-0415OC>
- Tang, C. H., Fu, X. J., Xu, X. L., Wei, X. J., & Pan, H. S. (2012). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides*, 36(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2012.04.014>
- Tan, Z., Xu, H., Shen, X., & Jiang, H. (2015). Nesfatin-1 antagonized rotenone-induced neurotoxicity in MES23.5 dopaminergic cells. *Peptides*, 69, 109–114. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2015.04.019>
- Tasatargil, A., Kuscü, N., Dalaklioglu, S., Adiguzel, D., Celik-Ozenci, C., Ozdem, S., ... Ozdem, S. (2017). Cardioprotective effect of nesfatin-1 against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: Role of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Peptides*, 95, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.003>
- Tasker, R. C. (2006). Changes in white matter late after severe traumatic brain injury in childhood. *Developmental Neuroscience* 28, (4-5), 302-8. <https://doi.org/10.1159/000094156>
- Tau, G. Z., & Peterson, B. S. (2009). Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>
- Tekin, T., Cicek, B., & Konyaligil, N. (2019). Regulatory Peptide Nesfatin-1 and its Relationship with Metabolic Syndrome. *The Eurasian Journal of Medicine*, 51(3), 280. <https://doi.org/10.5152/EURASIANJMED.2019.18420>
- Terraneo, L., Paroni, R., Bianciardi, P., Giallongo, T., Carelli, S., Gorio, A., & Samaja, M. (2017). Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biology*, 11, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.018>
- Threlkeld, S. W., Rosen, G. D., & Fitch, R. H. (2007). Age at developmental cortical injury differentially alters corpus callosum volume in the rat. *BMC Neuroscience*, 8, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-94>
- Torres-Cuevas, I., Parra-Llorca, A., Sánchez-Illana, A., Nuñez-Ramiro, A., Kuligowski, J., Cháfer-Pericás, C., ...Vento, M. (2017). Oxygen and oxidative

- stress in the perinatal period. *Redox Biology*, 12,674-681. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.011>
- Vives-Bauza, C., Starkov, A., & Garcia-Arumi, E. (2007). Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. *Methods in Cell Biology*, 80, 379–393. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80019-1)
- Volpe, J. J. (2000). Overview: Normal and abnormal human brain development. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review*,s 6(1), 1-5.. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2779\(2000\)6:1<1::AID-MRDD1>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2779(2000)6:1<1::AID-MRDD1>3.0.CO;2-J)
- Volpe, J. J. (2003). Cerebral white matter injury of the premature infant - More common than you think. *Pediatrics* 112, 176-80. <https://doi.org/10.1542/peds.112.1.176>
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO Journal*, 29(11), 1792-802. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74>
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102–1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
- Xu, J., & Ling, E. A. (1994). Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *Journal of Anatomy*, 184 ( Pt 2). PMID: 8014116 PMCID: PMC1259984
- Yamawaki, H., Takahashi, M., Mukohda, M., Morita, T., Okada, M., & Hara, Y. (2012). A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 676-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.076>
- Yiş, U., Kurul, S. H., Kumral, A., Cilaker, S., Tuğyan, K., Genç, Ş., & Yılmaz, O. (2008). Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain and Development*, 30(9), 556–562. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINDEV.2008.01.010>
- Zaghloul, N., Cohen, N. S., Ayasolla, K. R., Li, H. L., Kurepa, D., & Ahmed, M. N. (2023). Galantamine ameliorates hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2023.890015>
- Zaghloul, N., Nasim, M., Patel, H., Codipilly, C., Marambaud, P., Dewey, S., ... Ahmed, M. (2012). Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. *The Authors Journal Compilation*, 279, 871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08478.x>
- Zeiss, C. J. (2021). Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicologic Pathology*, 49(8), 1368-1373. <https://doi.org/10.1177/01926233211046933>
- Zhou, M., Schools, G. P., & Kimelberg, H. K. (2006). Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: Mature astrocytes are electrophysiologically passive. *Journal of Neurophysiology*, 95(1), 134-43. <https://doi.org/10.1152/jn.00570.2005>

Zusso, M., Stokes, L., Moro, S., & Giusti, P. (2020). Neuroinflammation and Its Resolution: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 541013. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00480/BIBTEX>



## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
ATG	: Autophagy-Related Genes / Otofaji İlişkili Genler
Bak	: Bcl-2 antagonist katili
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	: B-hücresi lenfoma-2
Bcl-XL	: B-hücresi lenfoma-XL
BDNF	: Brain-Derived Nerve Growth Factor / Beyin-Türevli Nörotrofik Faktör
Bid	: BH3 etkileşimini alan ölüm antagonist reseptörü
BPD	: Bronkopulmoner Displazi
C12orf44	: Otofaji ile ilgili protein 101 (ATG101)'i kodlayan gen
CAT	: Katalaz
dATP	: Deoksiadenosin trifosfat
ERK	: Extracellular Signal-Regulated Kinase / Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı
FasL	: Ölüme neden olan molekül Fas ligandı
Gd	: Gebelik Günleri
GDNF	: Glial-Derived Nerve Growth Factor / Glial Hücre Dizisinden Türetilen Nörotrofik Faktör
GFAP	: Glial Fibriler Protein
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Glutasyon Disülfit
IL-1 $\beta$	: İnterlökin-1 Beta
IL-6	: İnterlökin 6
JNK	: c-Jun NH2 terminal kinaz
LAMP2	: Lizozomla İlişkili Membran Proteinleri
LC3	: Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 / Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3
LIR	: LC3-Etkileşen Bölge
MBP	: Miyelin bazik protein
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTORC1	: Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 / Rapamisin Kompleksi 1'in Mekanik Hedefi
NF $\kappa$ B	: Nükleer Faktör Kappa B
OL	: Oligodendrosit
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PtdIns3K	: Tip III Fosfatidilinositol 3-Kinaz

PVDF	: Poliviniliden Florür
RB1CC1	: RB1 ile indüklenbilir sarmal sarmal protein 1
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOD1	: Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
SOD2	: Mitokondriyal Mangan Süperoksit Dismutaz
SOD3	: Ekstrasellüler Alana Salgılanan Süperoksit Dismutaz
SVZ	: Lateral Ventriküllerin Subventriküler Bölgesi / Subventriküler Bölge-Zon
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
ULK1/2	: Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz / Unc-51 like autophagy activating kinase



## 8. EKLER

Etik Onay Belgesi

EK 1

T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Yenidoğan sıçan beyinde hiperoksinin neden olduğu nöron ölümünde nesfatın-1 peptidinin koruyucu etkisinin araştırılması</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Zehra MINBAY BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dok. Öğr. Kıymet Zülal HALK Arş.Grv. Dr. Goncağul SAĞIR Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR Doç. Dr. Bülent GÖREN
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Serbest Araştırma Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.05.2020 – 01.05.2021
	KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	196 Adet Dişi – Erkek Sıçan

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
		ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2020 - 05 / 10	Tarih : 05.05.2020
		Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

### ETİK KURUL BİLGİLERİ

#### ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
[Redacted]	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	[Redacted]		
	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner-Fizyoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Ziraat- Zooteknik	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Sivil Üye	Emekli	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> C <input checked="" type="checkbox"/> H			

T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Nesfatın-1 peptidinin yenidoğan hiperoksik beyin hasarında bozulan hücresel ve moleküler mekanizmalar üzerine etkisinin araştırılması</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Zehra MİNBAY BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dok. Öğr. Kıymet Zülal HALK Arş. Grv. Ceren OY Prof. Dr. Esmâ GÜR Doç. Dr. Bülent GÖREN Arş. Grv. Dr. Beliz AKÇAKOCA
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Serbest Araştırma Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.08.2022 – 01.08.2023
KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	66 Adet Erkek – Dişi Sıçan	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
		ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2022 - 10 / 06	Tarih : 05.07.2022
		Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliğiyle çoğunluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
[Redacted]	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	[Redacted]		
	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Tıp- İmmunoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Ziraat- Zootečni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Sivil Üye	Emekli	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
	Veteriner Hekim	BUÜ- DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

## 9. TEŞEKKÜR

Tezin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini, özverilerini, bilgilerini, zamanlarını ve güler yüzünü esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. F. Zehra MİNBAŞY'a teşekkür ederim.

Tezim sırasında her türlü yardımlarından ve eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR'e ve diğer tüm Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Semiha ERSOY, Prof. Dr. Berrin AVCI, Dr. Öğretim Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN ve Dr. Öğretim Üyesi Sema SERTER KOÇOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmam için bana laboratuvarını açan Fizyoloji Abd. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülin ALKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince hem her zaman manevi yanımda olarak destek olan hem de deneysel aşamalarda yardımına koşan çok değerli çalışma arkadaşlarım başta Ceren OY olmak üzere Bilge ARICAN ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamı HDP(T)-2020-26 ve TGA-2022-1173 nolu projeler ile destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Doktora eğitimimi 2211 - Yurt İçi Doktora Burs Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Özel olarak da kendi hayatlarından fedakârlık yaparak her koşulda yanımda olan ve beni her zaman destekleyen canım annem ve babama, ayrıca teşekkürü en çok hak eden en güzel zamanlarımızdan vererek beni bekleyen, hafta sonları ben laboratuvarında çalışırken benimle mesai yapan birtanecik oğlum Yiğit Ata'ma her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

■■■■■■■■■■ yılında ■■■■■■■■■■'de doğdu. Lise öğrenimini Ali Fuat Kadirbeyođlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2012 yılında onur öğrencisi olarak mezun oldu. Ardından Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini 'Resveratrol ve Dialil Disülfidin Sıçan Testisinde Kadmiyum ile Oluşturulmuş Hasara Etkisi' başlıklı tez çalışması ile tamamladı ve doktora eğitimine yine aynı üniversite ve anabilim dalında devam etmiştir.

### **Burslar ve Ödüller**

GÜSİAD Bursu - 2009-2010 eğitim ve öğretim yılı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Bölüm İkinciliđi.

100/2000 YÖK Doktora Bursu

2211-a Genel Yurt İçi Doktora Bursu, TÜBİTAK.