



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN BEYİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERNA ÖZBEY

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. METEHAN UZUN**

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN BEYİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Berna ÖZBEY

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Metehan UZUN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TYL-2021-3611

Çanakkale – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Berna ÖZBEY tarafından Prof. Dr. Metehan UZUN yönetiminde hazırlanan ve 22/03/2023 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Deneysel Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Piseatannolün Beyinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Metehan UZUN

(Danışman)

Prof. Dr. Sedat YILDIZ

Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU

Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU

Doç. Dr. Ümit Ali MALÇOK

.....

.....

.....

.....

.....

Tez No : 10538642

Tez Savunma Tarihi : 22/03/2023

.....
Doç. Dr. Yener PAZARCIK

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Berna ÖZBEY

22/03/2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitim ve öğretimim boyunca her zaman engin bilgilerini, deneyimlerini, ilgisini, sabrını ve sonsuz yardımlarını esirgemeyen akademik başarılarını kendime örnek aldığım saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Metehan UZUN'a

Akademik hayatımda kıymetli ve engin bilgileriyle ilerlememi, gelişmemi sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU ve Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU'na

Tez çalışmamın deneysel sürecini değerli katkılarıyla ve tecrübeleriyle kolaylaştıran Doç. Dr. Ümit Ali MALÇOK ve Dr. Öğr. Üyesi Ali AKAR'a

Çalışmamda bilgilerini, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Başak BÜYÜK'e, hem deneysel süreçte hem diğer süreçlerde her zaman değerli zamanlarını, desteklerini ve bilgilerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZTOPUZ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif OVALI'ya

Bu sürece birlikte başladığımız ve bu sürecin sorunsuz ilerlemesinde en büyük destekçilerimden sevgili arkadaşım Gülfem ERBİL'e, analiz ve tez yazım sürecinde destek ve bilgileriyle sürecimi kolaylaştıran değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Cemre AYDEĞER ve Ufuk DEMİR'e, ailem gibi gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki arkadaşlarıma,

Çalışmama maddi destek sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (ÇOMÜBAP),

Bugüne kadar hem maddi hem manevi desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük fedakarlıklar göstererek amaçlarıma ulaşmamı kolaylaştıran canım aileme, Teşekkürlerimi sunarım.

Berna ÖZBEY
Çanakkale, Mart 2023

ÖZET

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA PİSEATANNOLÜN BEYİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berna ÖZBEY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Metehan UZUN

22/03/2023, 102

Subaraknoid kanama (SAK) insanlarda yaygın olarak görülmekte olup beyin hasarına ve ölümlere yol açmaktadır. Günümüzde SAK'ın halen kesin tedavisi yoktur. SAK patogeneğinde rol alan mekanizmalardan bir tanesi de endoplazmik retikulum stresidir (ERS). ERS'nin beyin hücrelerinde apoptoz ile kan-beyin bariyerinin bozulmasına yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada deneysel SAK modeli oluşturulmuş sıçanlarda piseatannolün (PST) frontal korteksteki ERS ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 8-10 haftalık Wistar Albino sıçanlardan SHAM (n=8), SAK (n=8) ve PST (n=8) olmak üzere üç grup oluşturuldu. SAK ve PST gruplarında, 120 µl otolog arteriyel kan prekiazmatik sistemine enjekte edilerek SAK modeli oluşturuldu. PST grubuna SAK sonrası 60. dakikada 30 mg/kg PST intraperitoneal yolla enjekte edildi. Tüm gruplarda SAK öncesi ve sonrası garcia nörolojik muayenesi, rotarod testi ve horizontal bar skorlaması yapıldı. SAK'tan 24 saat sonra frontal korteks dokuları alınarak histopatolojik ve genetik analizler gerçekleştirildi.

PST uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmak üzere nörodavranışsal test sonuçlarında iyileşmeye ($p<0,01$; $p<0,05$) ve histopatolojik düzeyde piknoz ($p<0,001$), ödem ($p<0,001$), kristal viyole boyalı hasarlı hücre ($p<0,01$) ve TUNEL⁺ apoptotik hücre sayısında ($p<0,05$) azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. SAK grubunda GRP78 ($p=0,01$), ATF4 ($p=0,01$) ve CHOP ($p<0,05$) gen ekspresyon seviyeleri SHAM grubuna göre yüksek

bulundu. PST uygulaması SAK'ta artan tüm ERS göstergelerini azaltıcı etki gösterdi. Bu azalma GRP78 için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). PST ayrıca SAK'ta artan p53 ($p<0,01$) gen ekspresyon değerlerini azaltıcı etki gösterdi.

Sonuç olarak, SAK sonrası artan ERS üzerine PST'nin koruyucu etki gösterdiği anlaşıldı. Bu bulgulardan yola çıkarak, SAK tedavisinde PST'nin destekleyici bir adjuvant ajan olarak kullanım potansiyeli olduğu anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Subaraknoid Kanama, Erken Beyin Hasarı, Piseatannol, Endoplazmik Retikulum Stresi, Apoptoz



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PICEATANNOL ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ON BRAIN IN RATS WITH EXPERIMENTAL SUBARACHNOID HEMORRHAGE MODEL

Berna ÖZBEY

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Department of Physiology Master's Thesis

Advisor: Prof. Dr. Metehan UZUN

22/03/2023, 102

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a common neurologic disorder accounts for brain injury, diminished neuron function, and neuron death. Due to various options, SAH treatment still remains lacking. Endoplasmic reticulum stress (ERS) in brain is known as the disruption of blood-brain barrier triggering neuron apoptosis contributes to SAH pathogenesis. The aim of this study is to investigate the effects of piceatannol (PST) on ERS and neuron apoptosis in an experimental SAH model in rats.

For this purpose 24 Wistar Albino male rats (8-10 w) were randomly divided into three groups; SHAM (n = 8), SAH (n = 8), and PST (n = 8). SAH model was induced via injection of 120 µl of autologous blood into prechiasmatic cisterna. 30 mg/kg PST was injected intraperitoneally after 60 minutes from SAH inducement. Garcia neurologic examination, the rotarod test, and horizontal bar tests were applied for neurological evaluation. Frontal cortex specimens were harvested for histological and gene expression evaluation.

Our results indicated that PST treatment significantly improved neurological scores ($p<0,01$; $p<0,05$). In addition PST decreased pyknosis ($p<0,001$) and edema ($p<0,001$) levels, alleviated the number of damaged cells ($p<0,01$) and apoptotic cells ($p<0,05$). GRP78 ($p=0,01$), ATF4 ($p=0,01$) and CHOP ($p<0,05$) gene expression levels of SAH group were

increased compared to SHAM. Moreover PST significantly decreased the expression levels of p53 ($p < 0,01$).

In conclusion our results indicated that PST had protective effects on ERS after SAH. It could be suggested that PST might be a supportive adjuvant agent in SAH management.

Keywords: Subarachnoid Hemorrhage, Early Brain Injury, Piceatannol, Endoplasmic Reticulum Stress, Apoptosis



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

1.1. Subaraknoid Kanama.....	4
1.1.1. Subaraknoid Kanamanın Epidemiyolojisi.....	5
1.1.2. Subaraknoid Kanamanın Etiyolojisi.....	5
1.1.3. Subaraknoid Kanamanın Prognozu.....	6
1.1.4. Subaraknoid Kanamanın Patofizyolojisi.....	6
1.1.5. Erken Beyin Hasarının Mekanizması.....	7
1.2. Endoplazmik Retikulum.....	9
1.2.1. Endoplazmik Retikulum Yapısı.....	9
1.2.2. Endoplazmik Retikulumda Protein Sentezi.....	10
1.2.3. Post-Translasyonel Modifikasyonlar ve Protein Katlanması.....	11
1.2.4. ER ile İlişkili Protein Degradasyonu (ERAD).....	16
1.3. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	19
1.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR).....	21
1.3.2. PERK Sinyal Yolağı.....	23
1.4. Apoptoz.....	25
1.4.1. Endoplazmik Retikulum İlişkili Apoptoz.....	27
1.4.2. PERK Sinyal Yolağı ve Apoptoz.....	28

1.4.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB).....	28
1.4.4. p53.....	30
1.5. Piseatannol.....	31

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Subaraknoid Kanama ve Piseatannol.....	34
---	----

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması.....	35
3.2. Deney Tasarımı.....	37
3.3. Taşıyıcı Solüsyonu Hazırlanması ve Uygulanması.....	38
3.4. Piseatannol Çözeltisi Hazırlanması ve Uygulanması.....	38
3.5. Anestezi Uygulanması.....	38
3.6. Yöntem.....	38
3.6.1. Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması.....	38
3.7. Nörodavranışsal Değerlendirme.....	41
3.7.1. Garcia Nörolojik Muayene.....	41
3.7.2. Rotarod Testi.....	41
3.7.3. Horizontal Bar Skorlaması.....	44
3.8. Ötenazi ve Örneklerin Toplanması.....	46
3.9. Beyin Ödemi Tespiti.....	46
3.10. Genetik Analizler.....	46
3.10.1. Total RNA İzolasyonu.....	46
3.10.2. cDNA eldesi.....	47
3.10.3. Real Time PCR (qRT-PCR) Uygulanması.....	48
3.11. Histopatolojik Analizler.....	48
3.11.1. Hemotoksilen- Eozin (HE) Boyama.....	49
3.11.2. TUNEL Boyama.....	50
3.11.3. Kristal Viyole Boyama.....	50

3.12. İstatistiksel Analizler.....	51
------------------------------------	----

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Subaraknoid Kanama Model ve Mortalite Bulguları.....	52
4.2. Beyin Ödemi Analiz Bulguları.....	53
4.3. Nörodavranışsal Değerlendirme Bulguları.....	54
4.3.1. Garcia Skorlaması Bulguları.....	54
4.3.2. Rotarod Testi Bulguları.....	55
4.3.3. Horizontal Bar Skorlaması Bulguları.....	56
4.4. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişim Bulguları.....	58
4.4.1. GRP78 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	58
4.4.2. PERK Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	59
4.4.3. ATF4 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	60
4.4.4. CHOP Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	61
4.4.5. p53 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	62
4.4.6. NF-κB Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler.....	63
4.5. Histopatolojik Bulgular.....	64
4.5.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Bulguları.....	64
4.5.2. Kristal Viyole Boyama Bulguları.....	67
4.5.3. TUNEL Boyama Bulguları.....	70

BEŞİNCİ BÖLÜM TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Tartışma.....	73
5.2. Sonuç ve Öneriler.....	78
KAYNAKÇA	80
EKLER	I
EK 1. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

SAK	Subaraknoid kanama
BOS	Beyin omurilik sıvısı
EBH	Erken beyin hasarı
KİB	Kafa içi basıncı
SKA	Serebral kan akışı
SPB	Serebral perfüzyon basıncı
ER	Endoplazmik retikulum
ERS	Endoplazmik retikulum stresi
BiP	İmmüoglobulin bağlayıcı protein
GRP78	78-kDa glukozla düzenlenen protein
GRP94	94-kDa glukozla düzenlenen protein
ERAD	ER ile ilişkili degradasyon
UPR	Katlanmamış protein yanıtı
PERK	Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
IRE1	İnositol gerektiren enzim-1
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
eIF2 α	Ökaryotik başlatma faktörü-2 alfa
ATF4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
CHOP	C/EBP homolog protein
GADD34	Büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir protein
PST	Pisatannol
RES	Resveratrol
GSİ	Gecikmiş serebral iskemi
KBB	Kan beyin bariyeri
SRP	Sinyal tanıma partikülü
OST	Oligosakkarittransferaz
CNX	Kalneksin
CRT	Kalretikulin
UGGT	UDP-glikoz/glikoprotein glukozil transferaz
Hsp70	70-kDa ısı-şok proteinleri
ATPaz	Adenozin trifosfataz

ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
HE	Hemotoksilen-Eozin
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP nick uç etiketleme
%	Yüzde
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
Sec	Salgı
PDI	Protein disülfid izomeraz
ERAF	ER ile ilişkili katlama
TUDCA	Tauroursodeoksikolik asit
NRF-2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
HO-1	Heme oksijenaz-1
MDA	Malondialdehit
TXNIP	Tyiodoksin etkileşimli protein
HCY	Homosistein
EDEM	ER degradasyonunu arttıran alfa-mannosidaz benzeri protein
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
p50	NF- κB1
p52	NF- κB 2
p65	RelA

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Hayvanların gruplandırılması ve yapılan işlemler	36
Tablo 2	Horizontal bar skorlaması	44
Tablo 3	cDNA sentez protokolü	47
Tablo 4	PCR koşulları	47
Tablo 5	Real Time PCR bileşen miktarları	48
Tablo 6	HE boyama skoru	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Subaraknoid bölgenin şematik gösterimi	4
Şekil 2	Erken beyin hasarı mekanizması	8
Şekil 3	Endoplazmik retikulumun yapısını gösteren şematik bir şekil	10
Şekil 4	Salgı ve membran proteinlerinin sentezi ve translokasyonu	11
Şekil 5	Sinyal peptidi alanları	12
Şekil 6	Oligosakkaritlerin Oluşumu	14
Şekil 7	Disülfit bağ oluşumu	16
Şekil 8	ERAD mekanizması	19
Şekil 9	Katlanmamış protein yanıtı	22
Şekil 10	PERK sinyal yolağı	23
Şekil 11	ER ilişkili apoptoz ve PERK sinyal yolağı	27
Şekil 12	NF- κ B ve p53'ün ER aracılı apoptoz üzerine etkisi	31
Şekil 13	RES ve PST molekül yapısı	32
Şekil 14	Deney tasarım şeması	37
Şekil 15	Kuyruktan kan alınımını gösteren örnek görüntüler	39
Şekil 16	Subaraknoid kanama modelinin oluşturulmasını gösteren örnek görüntüler	40
Şekil 17	Rotarod testi uygulamasını gösteren örnek görüntüler	43
Şekil 18	Horizontal bar skorlama işlemini gösteren örnek görüntüler	45
Şekil 19	Gruplara ait subaraknoid bölgede kanama alanlarından örnek görüntüler	53
Şekil 20	Grupların beyin ıslak/kuru ağırlık oranı verilerinin yüzde olarak karşılaştırılması	54
Şekil 21	Garcia nörolojik skorlaması verilerinin karşılaştırılması	55

Şekil 22	Grupların SAK öncesi ve sonrası rotarod testi (20 rpm) verilerinin karşılaştırılması	56
Şekil 23	Horizontal bar skorlama verilerinin karşılaştırılması (3 mm)	57
Şekil 24	Horizontal bar skorlama verilerinin karşılaştırılması (5 mm)	58
Şekil 25	GRP78 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	59
Şekil 26	PERK gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	60
Şekil 27	ATF4 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	61
Şekil 28	CHOP gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	62
Şekil 29	p53 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	63
Şekil 30	NF- κ B gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	64
Şekil 31	SHAM grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE)	65
Şekil 32	SAK grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE)	65
Şekil 33	PST grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE)	66
Şekil 34	HE boyaması ile belirlenen hücresel piknoz verilerinin karşılaştırılması	66
Şekil 35	HE boyaması ile belirlenen hücresel ödem verilerinin karşılaştırılması	67
Şekil 36	Kristal Viyole ile boyama verilerinin karşılaştırılması	68
Şekil 37	SHAM grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole)	68
Şekil 38	SAK grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole)	69
Şekil 39	PST grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole)	69
Şekil 40	TUNEL boyama ile belirlenen TUNEL ⁺ hücre sayılarının karşılaştırılması	70

Şekil 41	SHAM grubuna ait örnek bir Frontal korteks doku kesiti (TUNEL)	71
Şekil 42	SAK grubuna ait örnek bir Frontal korteks doku kesiti (TUNEL)	71
Şekil 43	PST grubuna ait örnek bir Frontal korteks doku kesiti (TUNEL)	72



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), normalde beyin omurilik sıvısı (BOS) ile dolu olan ve araknoid ile pia mater arasında yer alan bölgeye kan sızması olarak tanımlanır. En sık nedeni travmadır. SAK herhangi bir travmaya bağlı olmadan da gelişebilir. Non-travmatik SAK, anevrizmal, non-anevrizmal veya perimezensefalik olabilir. SAK, yüksek morbidite ve mortalite ile seyrederek ve tüm inmelerin % 3-10'luk bir kısmından sorumludur. İnsanlarda SAK görülme sıklığı 100.000'de 6-28 arasında bildirilmekle birlikte bu oran bölgesel olarak değişkenlik göstermektedir (De Rooij vd., 2007). En çok 40-60 yaş aralığında görülür (Rinkel vd.,1998). Kanama sonrası 1. ayda mortalite oranı % 50 değerine ulaşmaktadır. Ölümlerin çoğu ise ilk hafta içinde olmaktadır. SAK'ta hastaların % 10'u kanamadan hemen sonra hastaneye ulaşmadan, % 25'i ise ilk 24 saat içinde kaybedilmektedir (Dietrich vd., 2000). SAK risk faktörleri arasında cinsiyet, hipertansiyon, sigara, alkol ve uyuşturucu madde kullanımı gösterilmektedir (Sundström vd., 2019).

Subaraknoid kanama patogenezinin altında yatan en temel mekanizma ilk 3 gün içerisinde ortaya çıkan erken beyin hasarıdır (EBH). Erken beyin hasarı beyin iskemisi, kan-beyin bariyeri (KBB) yıkımı, beyin ödemi, oksidatif stres yanıtı, inflamatuvar yolların aktivasyonu ve nöronal apoptoz dahil bir dizi karmaşık patofizyolojik süreci içerir. Birkaç gün veya daha uzun sürebilir (Cahill vd., 2006). Subaraknoid boşluğa kanın ekstrasvazasyonu, yoğun baş ağrısına ve kafa içi basınçta (KİB) artışa neden olur. Kafa içi basıncında artış ise, bölgesel serebral kan akışında (SKA) ve serebral perfüzyon basıncında (SPB) önemli bir azalmaya neden olur. Bozulmuş bölgesel SKA ya geçici ve yaygın ya da fokal iskemiyeye yol açabilir ve bu da başka patofizyolojik olayların gelişmesine sebep olur (Foreman vd., 2016).

Subaraknoid kanamanın patofizyolojisinde hücre içi organellerin fonksiyonel bozukluğu son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yapılan çalışmalar nükleus, endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve otofaji-lizozomal sistemin SAK seyri sırasında farklı işlevler sergilediği ve bu organellerdeki fonksiyonel bozuklukların SAK patofizyolojisine dahil edilebileceğini göstermektedir (Chen vd., 2015). Erken beyin hasarı sürecinde nöronlarda otofaji yolağının aktive olduğu ortaya konulmuştur.

Otofaji hücre homeostazının önemli bir bileşeni olmasına rağmen, aşırı otofaji hücre ölümüne neden olabilir ve SAK sonrası ortaya çıkan EBH'den sorumlu bir faktör olarak kabul edilir (Lee vd., 2009). Bunun yanı sıra, endoplazmik retikulum stresinin (ERS) endotel hücrelerinin apoptozisine ve kan-beyin bariyerinin bozulmasına kadar gidebilen apoptotik süreçleri başlattığı da bilinmektedir (Paschen vd., 2005). Bu nedenle SAK'ta ERS'yi azaltmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Endoplazmik retikulumdaki protein katlama kapasitesi ile işlenen protein yükü arasındaki dengenin ER'de bozulması ERS olarak tanımlanır (Cnop vd., 2012). Hemen hemen tüm biyolojik süreçlerde görev alan proteinlerin ve fonksiyonel işlev kazanmaları için üç boyutlu yapıları katlanmaları gerekir (Dobson vd., 1998). Polipeptitler sürekli olarak yanlış katlanma veya sitotoksik kompleksler halinde toplanma riski altındadır. Moleküler şaperonlar, proteinin yeniden katlanmasına yardımcı olarak ve protein agregasyonunu önleyerek bu sitotoksiteyi giderirler (Kampinga ve Craig, 2010). Protein homeostazının sağlanması için proteinler sürekli şaperon denetiminden geçerler (Tatar, 2018). ER'de protein katlanmaları, BiP (İmmüoglobulin bağlayıcı protein) diğer adıyla GRP78 (78-kDa glukozla düzenlenen protein) ve GRP94 (94-kDa glukozla düzenlenen protein) gibi ER şaperon proteinleri ve protein disülfid izomeraz ile peptidil-prolil izomeraz gibi enzimler tarafından kolaylaştırılır (Yoshida vd., 2001). Endoplazmik retikulumda doğru katlanmış proteinler golgi aygıtına gönderilirken yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler ER lümeninde kalırlar (Van der Kallen vd., 2009). Endoplazmik retikulum lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ER homeostazındaki değişikliklere ve sonuç olarak ERS'nin uyarılmasına neden olur (Wang ve Kaufman, 2016). Endoplazmik retikulum bu durumun düzeltilmesi ve protein homeostazisinin korunmasını sağlayacak sistemlere sahiptir. Yanlış katlanmış veya katlanamamış olan proteinler, ER içinde bulunan ER ile ilişkili protein degradasyonu (ERAD) kontrol sistemi ile yıkıma uğratılırlar ve böylece protein dengesi korunur (Chambers ve Marciniak, 2014).

Protein dengesini korunmasında bazen ERAD mekanizması yeterli gelmez, böyle durumlarda hücrede katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan yolak aktif hale gelir (Xu ve ark., 2005; Xu vd., 2018). Bu yolak, ER fonksiyonundaki homeostazinin yeniden sağlanması için gerekli önemli bir sinyal mekanizmasıdır (Van der Kallen vd., 2009). Bu yolağın aktivasyonu kontrol eden üç temel sensör proteini mevcuttur. Bunlar;

- 1- Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK)
- 2- İnositol gerektiren enzim-1 (IRE1)
- 3- Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6).

Bu üç protein normal şartlar altında GRP78 adı verilen şaperona bağlıdırlar ve bu sayede inhibe haldedirler (Osowski ve Urano, 2011). Uyarılmanın gerçekleşmesiyle GRP78 şaperonu, PERK, IRE1 ve ATF6'dan ayrılır. PERK ve IRE1 homodimerize olur. Bu transmembran proteinleri otofosforilasyon geçirerek aktive olurlar (Schöntal, 2012). Aktive olan PERK bir kinaz olarak ökaryotik başlatma faktörü-2'nin alfa alt birimini (eIF2 α) fosforile eder. p-eIF2 α ise ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4), pro-apoptotik C/EBP homolog protein (CHOP) ve GADD34 (büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir protein) gibi aşağı akış bir grup proteinin artışına yol açar (Hughes ve Mallucci, 2019). UPR'nin uyarılması sonucunda hücre normal sürecine geri dönebilir. Ancak, stres UPR mekanizmasının baş edilebileceği düzeyden daha fazla ise hücre ölümü gerçekleşecektir (Van der Kallen vd., 2009).

Hücrede gerçekleşen bu süreçlerin, SAK patofizyolojisi açısından da önemli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Park vd, 2004). ERS ve oksidatif stresin SAK'ta EBH patogenizine katkıda bulunduğu da yapılan birçok çalışmada da ifade edilmektedir (Ayer ve Zhang, 2008; Nakka vd., 2016). Bu nedenle SAK'ta ERS'nin azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması tedavi seçenekleri arasında değerlendirilmektedir. Bu amaçla birçok molekül üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmekte olup bu moleküllerden bir tanesi de pisetannol (PST)'dur.

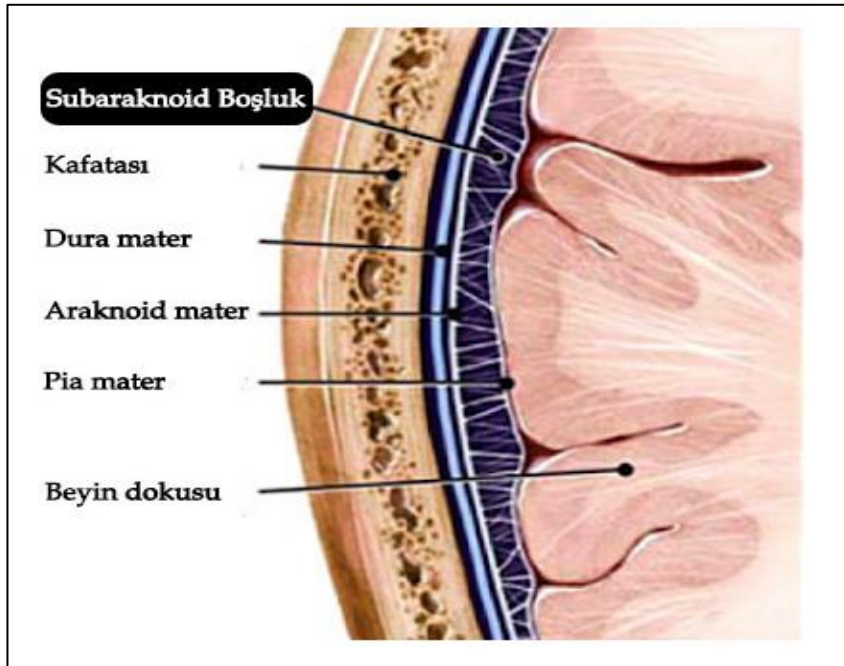
Yaban mersini, üzüm ve çarkıfelek meyvesi tohumlarında yaygın olarak bulunan PST bir resveratrol (RES) hidroksil analogudur (Boccellino vd., 2019). PST, RES'e göre daha yüksek bir biyoyararlanım oranına sahiptir (Fernandez-Mar vd., 2012; Savoia, 2012; Mikulsi vd., 2010). Bu durum PST'nin RES'e alternatif bir molekül olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. PST, kanserlere, kardiyovasküler hastalıklara, inflamasyona, hiperkolesterolemiye ve obeziteye karşı terapötik potansiyele sahiptir. Ayrıca, karaciğer ve kalp hasarı, kanser ve cilt hastalıklarının tedavisinde de kullanılabileceği belirtilmiştir (Hoshoda vd., 2021). PST'nin tedavi edici yönü sahip olduğu anti-inflamatuar,

anti-oksidatif ve anti-proliferatif aktiviteler sayesinde gerçekleşmektedir (Kalariya vd., 2013). Buna ek olarak yapılan çalışmalarda PST'nin ERS'yi azaltıcı veya ERS'ye karşı koruyucu etkinliği de ortaya konulmuştur (Kil vd., 2016; Wen vd., 2018). PST'nin ERS üzerine olan etkileri karaciğer, osteoblast hücreleri, endotelial hücreler gibi hücre ve organlarda ortaya konulmuş olmasına rağmen SAK'ta ERS üzerine nasıl bir etki gösterdiği henüz araştırılmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda PST'nin SAK'ta frontal korteksteki ERS düzeyi ve tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Subaraknoid Kanama

Subaraknoid boşluk, araknoid membran ile pia mater arasındaki boşluk olarak tanımlanır. BOS ve beynin farklı bölgelerini besleyen kan damarlarından oluşur. SAK, araknoid membran ile pia mater arasında bulunan ve subaraknoid boşluk olarak adlandırılan alanda kan birikmesi olarak tanımlanır (Ikawa vd., 2020). SAK, tüm inme türlerinin % 3'ünü oluşturan, % 85'i intrakraniyal anevrizmaların neden olduğu bir hemorajik inme türüdür (Macdonald ve Schweizer, 2017). Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden klinik bir olaydır (Kowalski vd., 2004).



Şekil 1. Subaraknoid bölgenin şematik gösterimi (“Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi”, t.y.), (“Subaraknoid Kanama?”, 2022).

1.1.1. Subaraknoid Kanamanın Epidemiyolojisi

İnme, dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada, sakatlık nedenleri arasında ise üçüncü sıradadır (Feigin vd., 2017). İnmeler hemorajik veya iskemik olabilir. Hemorajik inmeler, yaygın olarak tüm inmelerin yaklaşık % 32'sini oluşturmaktadır (Krishnamurthi vd., 2013). Hemorajik inmeler, SAK veya intraserebral kanamadan kaynaklanabilir. Çoğu spontan (travmatik olmayan) SAK'lar, rüptüre sakküler anevrizmalardan kaynaklanır. Subaraknoid kanamanın diğer nedenleri arasında travma, arteriyovenöz malformasyonlar, vaskülitler, intrakraniyal arter diseksiyonları, amiloid anjiyopati, kanama diyatezi veya uyuşturucu kullanımı (kokain ve amfetaminler) sayılabilir (Vlak vd., 2011).

Çoğu popülasyonda SAK, yılda 100.000'de 6-7 kişide görülmektedir. Ancak Finlandiya ve Japonya'da yaklaşık olarak 100.000 kişinin 20'sinde görüldüğü bildirilmiştir. Buna ek olarak düşük ve orta gelirli ülkelerdeki insidans oranının, yüksek gelirli ülkelerin neredeyse iki katı olduğu ifade edilmektedir (Feigin vd., 2009; de Rooij vd., 2007).

Hastalığın görülme yaşı cinsiyete ve yaşa bağlı olarak değişiklik de göstermektedir. SAK 55 yaşından önce erkeklerde, 55 yaşından sonra ise kadınlarda daha sık görülmektedir. İnsidans ise yaşla birlikte artmaktadır. Buna rağmen SAK geçiren hastaların yarısının 55 yaşından küçük olduğu bildirilmiştir. SAK insidansı son 45 yılda biraz azalmıştır (de Rooij vd., 2007).

1.1.2. Subaraknoid Kanamanın Etiyolojisi

Hastalığın etiyojisine bakıldığında SAK'ın travmatik ve non-travmatik olarak iki şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Travmatik olmayan SAK vakalarının yaklaşık % 85'i anevrizma yırtılmasına sekonder olarak ortaya çıkar. Geriye kalan % 15-20'lik kısmın farklı nedenleri mevcut olup, kanamanın mekanizması tam olarak tanımlanmamıştır. Tedavi kanamanın nedenine göre uyarlayanabildiği için kanamanın kesin etiyojisini belirlemek oldukça önemlidir (Ziu vd., 2022).

1.1.3. Subaraknoid Kanamanın Prognuzu

Subaraknoid kanamada erken dönemde ölüm oranı oldukça yüksektir. Nüfusa dayalı yapılan çalışmalarda vaka ölüm oranının yaklaşık % 50 olduğu ifade edilmektedir (van Gijn vd., 2007). SAK geçiren hastaların % 10'undan fazlasında ise orta veya ciddi düzeyde sakatlık kalmaktadır (Schatlo vd., 2021). Popülasyona dayalı yapılan bir çalışma, SAK geçiren hastaların yaklaşık % 18'inin bir hastanede değerlendirilmeden önce aniden öldüğünü göstermiştir. Hastaneye ulaşan hastalar arasında erken ölümler çoğunlukla ilk kanama, yeniden kanama, vazospazm, gecikmiş serebral iskemi (GSİ), hidrosefali, KIB artışı, nöbetler ve kardiyak komplikasyonlar vb. anevrizmal SAK'ın yaygın komplikasyonlarından kaynaklanır (Lindbohm vd., 2017). Nörobilişsel işlev bozukluğu, epilepsi ve diğer fokal nörolojik defisitler SAK'ın uzun süreli komplikasyonları arasında sayılabilir (Schatlo vd., 2021).

Subaraknoid kanama sonrası ortaya çıkan bazı komplikasyonlar aşağıda listelenmiştir:

1. Nöbetler,
2. Vazospazm,
3. Yeniden kanama,
4. Hidrosefali,
5. Artmış kafa içi basıncı,
6. Beyin enfarktüsü,
7. Nörojenik pulmoner ödem,
8. Ölüm (Ziu vd., 2022).

1.1.4. Subaraknoid Kanamanın Patofizyolojisi

Hastalığın patofizyolojisi üzerine yürütülen deneysel ve klinik çalışmalar son yıllarda, kanama sonrası ilk 72 saatte ortaya çıkan ve yaygın olarak görülen "EBH" olarak adlandırılan patofizyolojik mekanizmalara doğru eğilim göstermiştir. EBH ilk olarak 2004 yılında Kusaka vd. (2004) tarafından tanımlanmıştır (Kusaka vd.,2004). EBH'nin GSİ ve

SAK sonrası uzun vadeli morbidite ve mortalite arasında önemli bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (Ahn vd., 2018; de Oliveira Manoel vd., 2016).

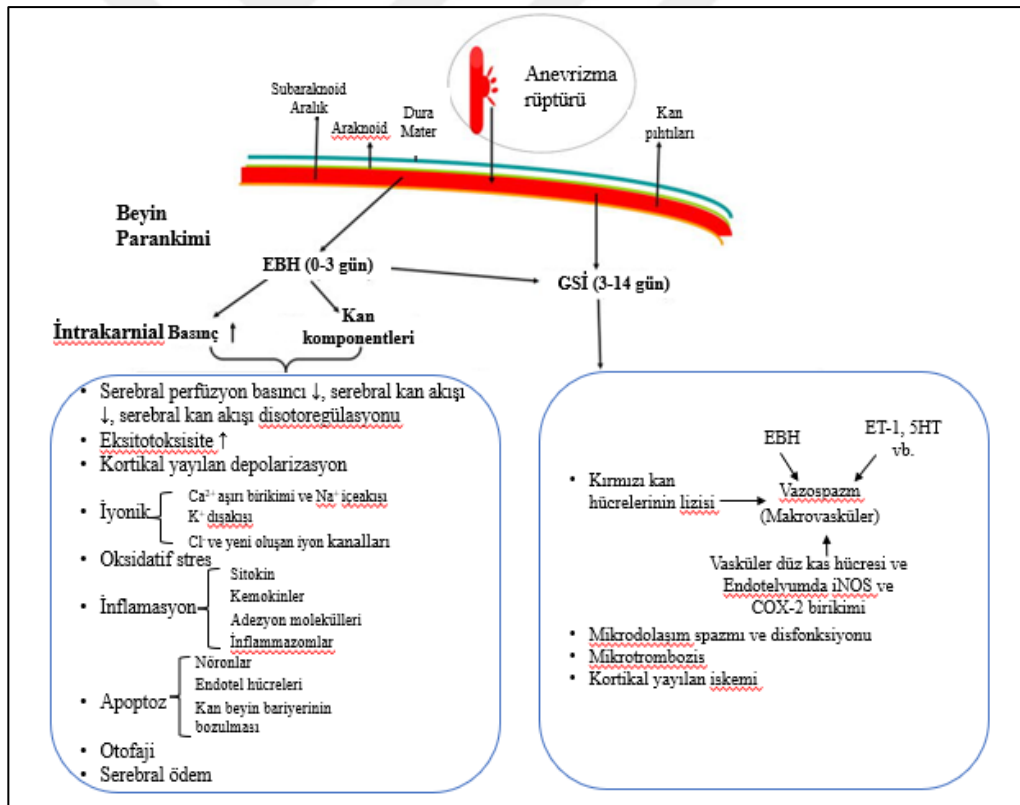
1.1.5. Erken Beyin Hasarının Mekanizması

Mekanizması oldukça karmaşık olan EBH, SAK'tan birkaç dakika sonra oluşmaya başlar. Birkaç gün veya daha uzun süren beyin iskemisi, KBB yıkımı, beyin ödemi, oksidatif stres tepkisi, immün inflamatuvar yol ve nöronal apoptoz dahil bir dizi karmaşık patolojik ve fizyolojik olayı içerir (Tian vd., 2020). EBH'nin patofizyolojik mekanizmalarının kanamadan hemen sonra başladığına dair artan kanıtlar mevcuttur. Subaraknoid boşlukta kanın ekstrasvazasyonu KİB'de ani bir artışa neden olur. KİB'deki bu artış kanama (Monroe-Kellie Hipotezi), vazoparalizi ve BOS drenaj tıkanıklığına bağlı olarak hacimdeki artışla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen altta yatan mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamıştır. Artmış KİB, serebral perfüzyonda azalmaya, otonöregülasyon bozulmasına ve ciddi vakalarda geçici veya kalıcı iskemiye de neden olur (Gaasch vd., 2018; Grote ve Hassler, 1988).

KİB'deki bu artış aynı zamanda SKA'da azalmaya yol açar (Bederson vd., 1995). SKA'deki azalma ve buna eşlik eden KİB'deki artış, anevrizmaya bağlı kan kaybını kontrol etmekte koruyucu bir mekanizma olabilir. Deneysel modellerde SKA neredeyse sıfıra düşebilir (Ostrowski vd., 2006). Bu durum, klinik ortamda gözlemlenen senkop ile örtüşmektedir. Kan basıncındaki azalma da yine kan kaybını azaltmak için koruyucu bir mekanizma olabilir. Hastalar hastaneye ulaştıklarında SPB'yi korumak için hipertansif olabilirler. Son olarak, belki de vazodilatasyonun bir sonucu olarak serebral kan hacmi artıyor olabilir.

Gelişen bu olaylar sonucunda SAK sonrası beyin dokusunda çeşitli değişimler ortaya çıkar. Mikrodolaşım bozukluğu, mikrotromboz, değişmiş iyonik homeostaz, eksitotoksisite, oksidatif stres ve nöronal şişmeler meydana gelir. Bunlar ise nöronal hücre ölümüne ve endotel hasarına yol açar. Artan hücre ölümü ve endotel hasarı ise vazojenik ödem gelişimini şiddetlendiren sitotoksik ödeme ve KBB yıkımına sebep olur. Subaraknoid boşlukta kan ve intraserebral kanamanın varlığı, mikroglial aktivasyon ve proinflamatuvar yanıtın başlaması beyin hasarını şiddetlendirebilir (Cahill vd.,2006; Şekil 2).

Yapılan tedaviler sonucunda dokularda meydana gelen hasar azaltılarak kişilerin normal hayatlarına dönmeleri sağlansa da hasarın boyutu ve tedavinin etkinliği oldukça önemlidir. Çünkü SAK geçirip hayatta kalanlar arasında, % 50'ye kadarının uzun vadede bir miktar bilişsel işlev bozukluğu yaşadığı tahmin edilmektedir (Bonita ve Thomson, 1985; Kreiter vd., 2002). Davranış ve hafızayı da içeren çeşitli değişikliklerin EBH'nin sonucu olduğuna ve tek başına vazospazm ile açıklanamayan uzun vadeli komplikasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir. Belirtildiği gibi artan KİB ve azalan SKA'ya ikincil global iskemik hasarın bir sonucu olarak, SAK sonrası beyinde apoptozun tetiklendiği bilinmektedir. Bununla beraber yapılan çalışmalar antiapoptotik tedavinin SAK hastalarının prognozunu iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenlerle SAK sonrası apoptozun moleküler mekanizmasının belirlenmesi SAK hastalarını anlamak ve tedavi etmek için oldukça önemlidir (Zubkov vd., 2001; Park vd., 2004; Ostrowski vd., 2005; Zhou vd., 2005).



Şekil 2. Erken beyin hasarı mekanizması (Chen vd., 2014).

Apoptotik süreçlerde etkili olan en yaygın mekanizma ise EBH'dir. EBH'nin altında yatan sebeplerden biri de apoptozu indükleyebilen ERS'dir (Tian vd., 2020). Bu nedenle EBH'nin ve apoptozun mekanizmalarının belirlenmesi için SAK'ta ER ve ERS'nin mekanizmalarının ortaya konulması oldukça önem arz etmektedir.

1.2. Endoplazmik Retikulum

Hücredeki en büyük organel ER'dir. Proteinlerin sentezlenmesi, taşınması ve katlanması, karbonhidrat metabolizması, lipid ve steroid sentezi ile kalsiyum depolanmasında görevlidir. ER benzersiz ve çok işlevsel bir fiziksel yapıya sahiptir. Bu özellikleri sayesinde işlevlerini hücre içi ortamdaki değişikliklerle koordineli bir şekilde yürütebilir ve bu değişikliklere yanıt verebilir. Çalışmalar, ER'nin her biri belirli işlevlerle ilişkili olan çok sayıda farklı yapısal alanlardan oluştuğunu göstermektedir (Schwarz ve Blower, 2016). Fakat bu fonksiyonel alanların nasıl organize olduğu ve farklı yapılara nasıl dönüştüğü günümüzde tam olarak açıklanamamıştır.

1.2.1. Endoplazmik Retikulum Yapısı

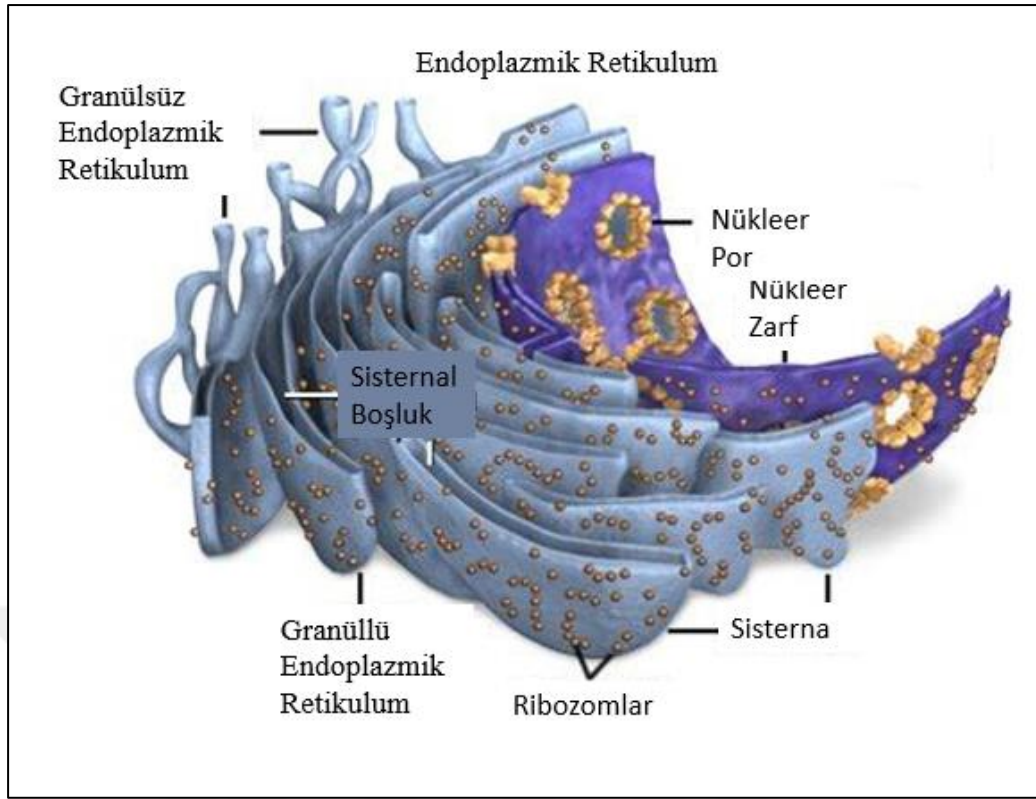
Yapısal olarak ER kapalı, yassılaştırmış bir zar ile çevrelenmiş ve sisterna olarak adlandırılan keseciklerden oluşan geniş bir ağdır. Granüllü/kaba ER ve granülsüz/düz ER olmak üzere iki tip ER bulunur. Her ik ER de yapısal ve fonksiyonel olarak farklı olsalar da birbirlerinin devamı olduğu düşünülmektedir. ER birbiri anastomoz yapan membran ile yassı kesecikler, tubüller ve sisternalardan (geniş boşluk) oluşur (Şekil 3).

1. Granülsüz Endoplazmik Retikulum

Granülsüz ER üzerinde ribozom bulundurmeyen ER tipidir. Bu ER yağ asitlerinin ve fosfolipitlerin sentezinde, kalsiyum depolanmasında ve detoksifikasyonda görev alır.

2. Granüllü Endoplazmik Retikulum

Granüllü ER'nin dış yüzünde ribozomlar bulunur. Granüllü ER'ye bağlı sitoplazmik ribozomlarda bazı membran ve organel proteinleri ile hücreden salgılanan hemen hemen tüm proteinler sentezlenir.



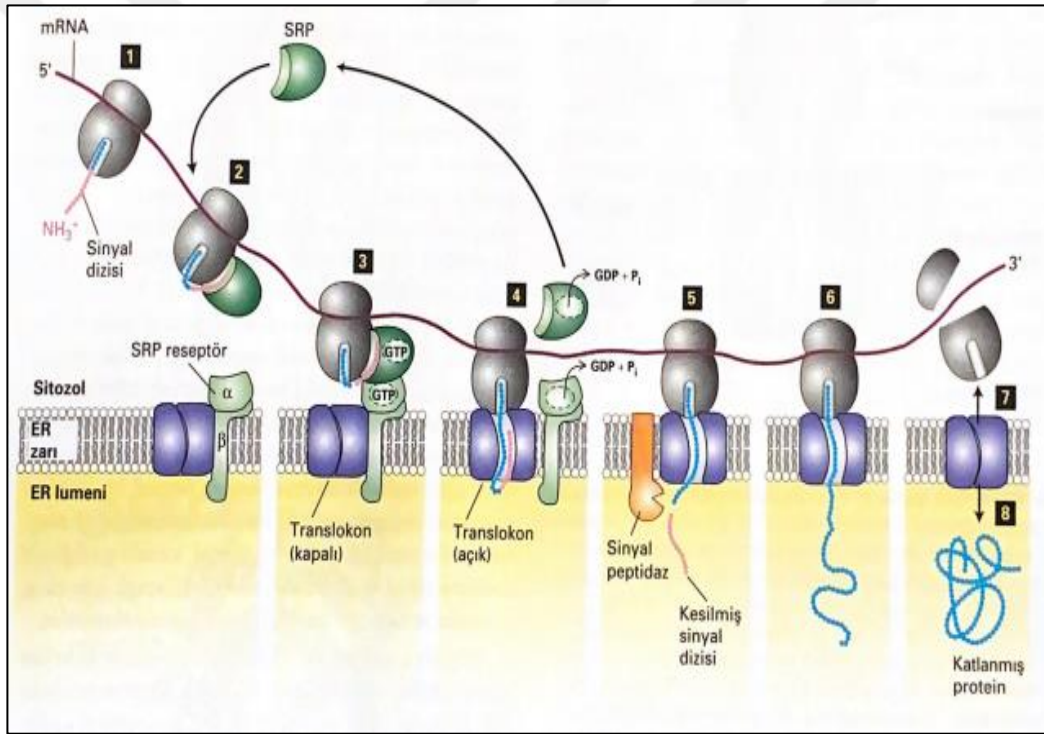
Şekil 3. Endoplazmik retikulumun yapısını gösteren şematik bir şekil (“Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi”, t.y.), (“Endoplazmik retikulumun 3D yapısı?”, 2022).

1.2.2. Endoplazmik Retikulumda Protein Sentezi

Hücre içerisinde kullanımı gerçekleşmeyecek proteinlerin sentezinde Granüler ER’de çeşitli olaylar meydana gelir. Salgı veya integral membran proteinlerinin translasyonu hücrenin sitozolinde başlar, daha sonra bu mRNA’ları içeren ribozomlar, sinyal tanıma partikülü (SRP) tarafından tanınan ve bağlanan yeni oluşan polipeptidin amino terminali içindeki bir sinyal dizisi yoluyla ER membranına alınır (Walter vd.,1981). mRNA-ribozom-yeni oluşan polipeptit-SRP kompleksi, ER membranında bulunan SRP reseptörüne tutunur. Bu tutunma sonucunda proteinler ER lümenine girerler (Gilmore vd.,1982). Translasyon ER’de devam eder ve ortaya çıkan polipeptit, Sec (salgı) proteinleri bulandıran translokon aracılığıyla ER membranına ko-translasyonel translokasyon yolu ile girer (Rapaport, 2007; Şekil 4).

Translasyon tamamlandıktan sonra, bir sinyal peptidaz, kısa sinyal peptidi bölerek serbest proteinin ER lümenine geçmesini sağlar (Evans, 1986). Protein, bir hidrofobik kalıntı veya transfer durdurucu kenetleyici dizisinin varlığı ile belirlenen bir integral membran

proteini olacak ise, translokasyon durdurulur. Bu noktada protein yana doğru kaydırılır ve kaldığı yerde fosfolipit çift tabakası içinde sabitlenir (Blobel,1980). Transmembran proteinleri bir hidrofobik amino asit dizisi içeriyorsa tek geçişli transmembran proteinler olarak sınıflandırılırlar. Eğer çok sayıda bölge içerirlerse çok geçişli transmembran proteinler olarak tanımlanırlar (Braakman ve Hebert, 2013). Eğer protein bir membran protein değil de bir salgı proteini olacaksa protein taşıma süreci başlatılır. Translasyon tamamlandıktan ve sinyal peptidi bölündükten sonra ribozomlar sitozole geri salınır (Seiser ve Nicchitta,2000; Potter ve Nicchitta,2000). Translasyon işlemi biten proteinler ER içerisinde post-translasyonel modifikasyonlar geçirir ve katlanırlar (Walter vd.,1981).



Şekil 4. Salgı ve membran proteinlerinin sentezi ve translokasyonu (Lodish vd., 2011).

1.2.3. Post-Translasyonel Modifikasyonlar ve Protein Katlanması

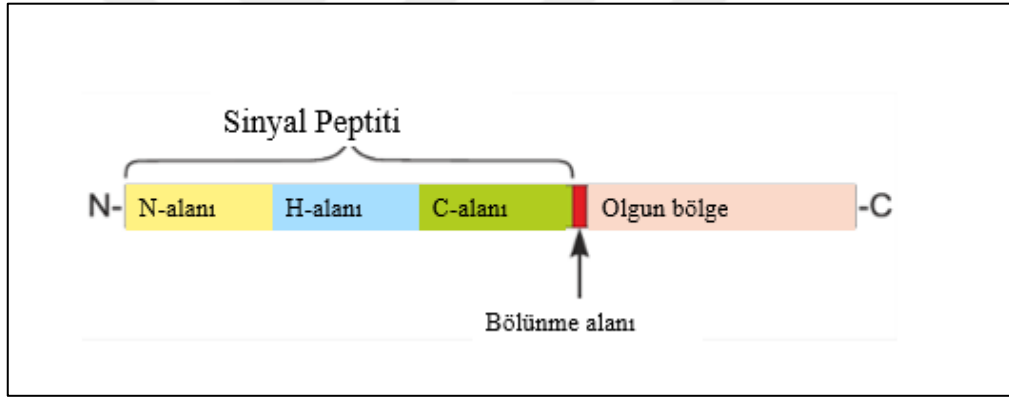
Protein sentezini ve ER lümenine translokasyonunu takiben, salgılanması hedeflenen bir protein şaperonlar ve katlama enzimlerinin yardımıyla uygun katlanmadan geçmelidir.

Proteinler bu amaçla dört farklı işleme tabi tutulurlar. Bunlar;

- Sinyal peptit bölünmesi
- N-Bağlı glikozilasyon
- Şaperonlar ve ko-şaperonlar ile katlanma
- Disülfid bağı oluşumu (Braakman ve Hebert, 2013).

a) Sinyal Peptit Bölünmesi

Birçok protein ilk 25 aminoasidinde bulunan sinyal dizileri tarafından ER'ye ko-translasyonel olarak hedeflenir. Sinyal dizileri, bir amino-terminal temel alan (N-alanı), bir medial hidrofobik alan (H-alanı) ve bölünme bölgesini (C-alanı) içeren bir polar alandan oluşur (Hegde ve Bernstein,2006; Şekil 5).



Şekil 5. Sinyal peptiti alanları (Burdukiewicz vd., 2018).

Translokasyon sırasında N ve H alanları peptitin, amino terminalini sitoplazmaya, H alanını lipid çift tabakasının çekirdeğine ve C alanını sinyal peptidaz kompleksi tarafından tanıma ve bölünme için lümeneye bakacak şekilde konumlandırılmasına yardımcı olur.

Bir proteinin ER'ye yönlendirilmesi ve ER'ye translokasyonunun verimliliği sinyal dizisine bağlı olarak değişir. Transloke olduktan sonra sinyal dizisinin bölünme zamanlaması proteine bağlıdır. Katlanmanın ilk aşamalarında amino-terminalin membrana bağlanmasının, erken katlanma ve olgunlaşma süreçlerinin yönlendirilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bölünmenin zamanlaması önemli olabilir (Braakman ve Hebert, 2013).

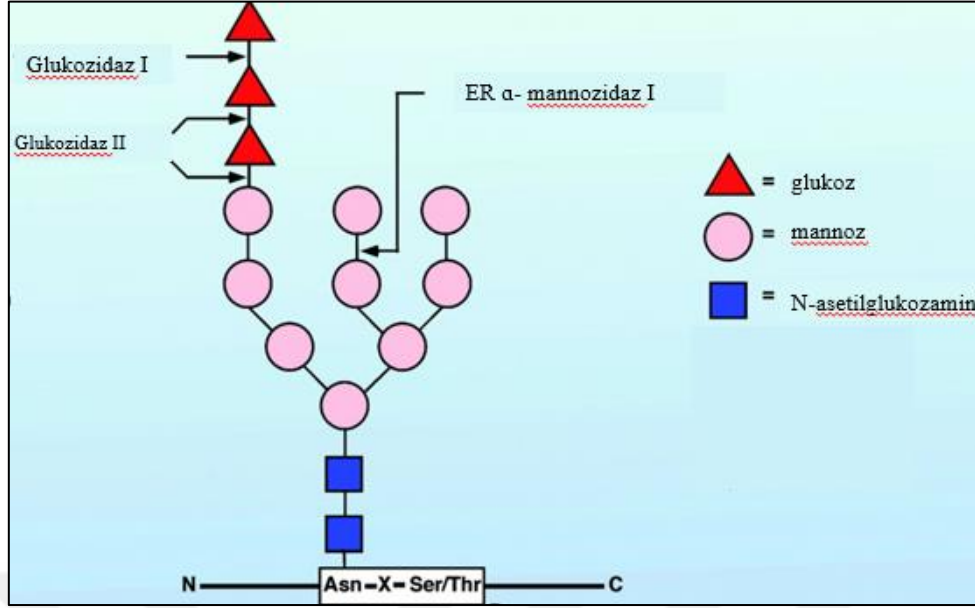
Son kanıtlar, sinyal dizilerinin sadece geçici hedefleme bilgisi sağlamadığını, bir proteinin katlanmasını, modifikasyonunu, lokalizasyonunu ve topolojisini de etkileyebileceğini göstermektedir (Ding vd., 2005; Piersma vd., 2006; Bonfanti vd., 2009).

b) N-Bağlı Glikozilasyon

ER lümenine giren polipeptitler, önceden oluşturulmuş oligosakkarit $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc: glukoz, Man: mannoz, GlcNAc: N-asetilglukosamin)'nin translokon kompleksi ile ilişkili bir enzim ile modifiye edilirler. Bu işlem oligosakkarittransferaz (OST) tarafından katalize edilen Asn-xxx-Ser/Thr dizilerindeki asparagin yan zincirlerine kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşir (Shibatani vd., 2005; Ruiz-Canada vd., 2009).

N-glikanların transferi, ko-translokasyonel olarak gerçekleşir. N-glikanların en dıştaki iki glikoz kalıntısı, glukozidaz I ve II aracılığıyla sırayla çıkarılır. Böylece monoglukosile edilmiş oligosakkaritler ($\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$) elde edilir (Grinna ve Robbins, 1979; Şekil 6).

Bu N-glikanlar, agregasyonu ve ER'den erken çıkışı önleyerek uygun katlamayı destekleyen şaperonlar olan kalneksin (CNX) veya kalretikulin (CRT) tarafından tanınır (Williams, 2006; Rutkevich ve Williams, 2010). En içteki glikoz kalıntısının glukosidaz II tarafından kırılması, bu polipeptitleri CNX/CRT'den serbest bırakır. UDP-glikoz/glikoprotein glukozil transferaz (UGGT), salınan glikoproteinlerin katlanma durumunu algılar ve doğru konformasyon elde edilmemişse, UGGT, N-glikanı CNX/CRT tarafından yeniden bağlanmak üzere tekrar reglukozile eder (Solda vd., 2007; D'Alessio vd., 2010). Bu şekilde, N-glikanın yapısı, glikoproteinlerin katlanma durumu için gerekli bilgileri kodlar (Hebert vd., 2005; Aebi vd., 2010). Bu sürecin sonunda doğru katlanmış proteinler bu döngüden salınır ve gidecekleri yere taşınır (Molinari 2007; Lederkremer, 2009).



Şekil 6. Oligosakkaritlerin oluşumu (Helenius ve Aebi, 2001).

c) Şaperonlar ve Ko-şaperonlar ile Katlanma

CNX/CRT kompleksi dışında, ER'deki diğer şaperon sistemi BiP/GRP78 veya Hsp70 (70-kDa ısı-şok proteinleri) sistemidir. GRP78, en çok bulunan ER şaperonlarından biridir ve ER'de katlanmadan ERAD'a kadar çok sayıda işleve sahiptir. GRP78, katlanmamış substratlara bağlanmak için uygun bir hidrofobik bölge içeren bir ATPaz (adenozin trifosfataz) alanı ve bir substrat bağlama alanı olarak isimlendirilen iki alandan oluşur. ATP'nin (adenozintrifosfat) hidrolizinden sonra, ADP'ye (adenozin difosfat) bağlı GRP78, hidrofobik bölgenin kapalı olduğu substratlar için yüksek bir afinite kazanır. GRP78, substratlara yüksek afinite ile bağlanarak katlanmamış proteinlerin agregat oluşturmasını engeller. Bu haliyle GRP78, polipeptitin katlanmamış veya yanlış katlanmış bölgelerini tanır ve birleştirmeye yardımcı olur (Hendershot, 2004).

Yakın zamanlarda ER'de DnaJ/Hsp40 ailesi üyeleri (ERdj1-7) olarak bilinen yedi BiP ko-şaperonu tanımlanmıştır. Ko-şaperonlar Hsp70 veya BiP ile bağlanma için gerekli His-Pro-Asp motifine sahip bir J-domain içerirler. Bu ko-şaperonlar sadece BiP'in ATP hidrolizinin uyarılmasında değil, aynı zamanda çeşitli faaliyetlerinin düzenlenmesinde de belirleyici ve kritik bir rol oynar. BiP'in ADP formu, BiP'i substratlar için açık ve erişilebilir forma yönlendiren GRP170 ve Sil1/BAP gibi nükleotid değişim faktörleri tarafından ATP

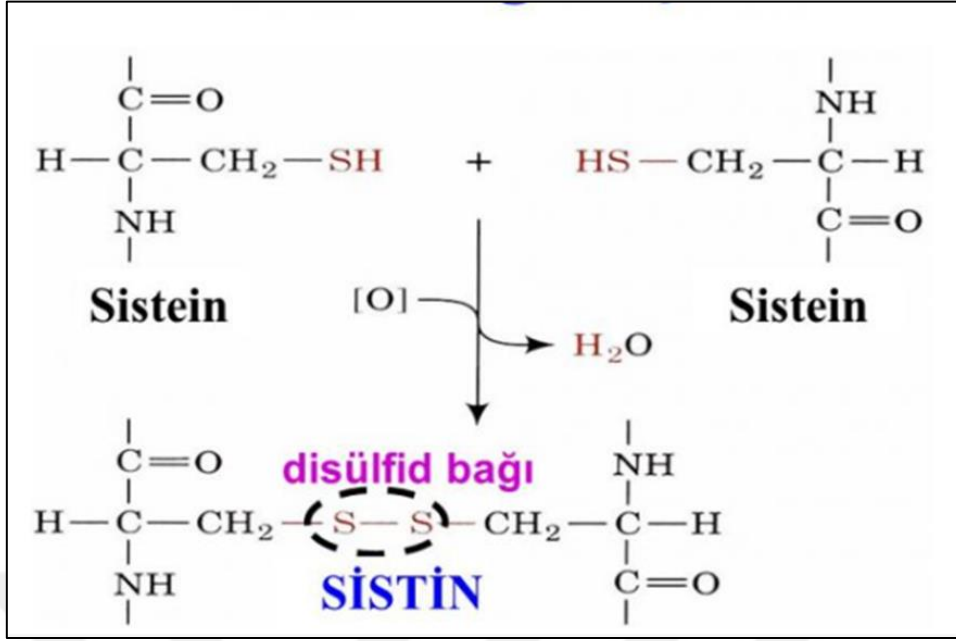
formuna dönüştürülür (Chung vd., 2002; Kampinga ve Craig, 2010). DnaJ ailesi koşaperonları ve nükleotid değişim faktörleri tarafından düzenlenen BiP'in bu hidrolitik döngüsü, ER'de yeni oluşan ve yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonunu önleyerek çözünürlüğünü sağlar.

Hsp40 ailesi proteinlerinden ERdj1, ERdj2, ERdj4 ve ERdj7 trans-membran alanlara sahipken diğerleri ER luminal proteinlerdir. ERdj3 ve ERdj6'nın ER stresi tarafından yukarı regüle edildiği bildirilmiştir. ERdj1 ve ERdj2 yeni sentezlenen polipeptitlerin ER'ye translokasyonunu kolaylaştırmak için muhtemelen BiP'i translokon geçidine alır. Ayrıca ER ortamını korumak için translokon kanalını kapatır. ERdj3, ER'de katlanma sırasında doğrudan immünoglobulin G'ye bağlanan bir çoklu protein kompleksinin bir bileşeni olarak tanımlanmıştır (Meunier vd., 2002; Shen ve Hendershot 2005; Jin vd., 2008).

ERdj4 ve ERdj5'in ise yanlış katlanmış proteinlerin ERAD mekanizmasını arttırdığı bildirilmiştir. ERdj5'in EDEM (ER degradasyonunu arttıran alfa-mannosidaz benzeri protein) ile etkileşime girdiği ve aşırı eksprese edilen ERdj4 ve ERdj5'in ERAD mekanizmasının bir bileşeni olan p97 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dong vd., 2008; Ushioda vd., 2008; Ushioda ve Nagata, 2011). ERdj6'nın başlangıçta sitozolde PERK fosforilasyonunu negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Gale vd., 1998; Yan vd., 2002). ERdj6 BiP'e J alanı veya tetratrikopeptit tekrar alanı aracılığıyla bağlanarak ve bir koşaperon olarak işlev görür. ERdj6 büyük olasılıkla ER lümeninde yeni sentezlenen proteinlerin verimli bir şekilde katlanmasında rol oynar (Petrova vd., 2008). Yapılan proteomik analizler, trans-membran ve luminal alana sahip başka bir Hsp40 ailesi proteini ERdj7'yi ortaya çıkarmıştır (Zahedi vd., 2009).

d) Disülfit Bağ Oluşumu

Disülfit bağlarının oluşumu protein fonksiyonu ve stabilitesi için gerekli olan ER'de gerçekleşen bir diğer adımdır (Appenzeller-Herzog, 2011). ER'nin oksidatif ortamı, disülfit (S-S) bağları oluşturmak için sisteinler üzerindeki serbest sülfhidril (SH) gruplarının oksidasyonu için uygun bir ortamdır (Şekil 7).



Şekil 7. Disülfid bağ oluşumu (Söğüt, 2017).

Protein disülfid izomeraz (PDI) ailesi proteinleri olarak adlandırılan oksidoredüktazlar, bir oksidaz ve izomeraz gibi hareket ederek bu reaksiyonları katalizleyerek doğal disülfidlerin oluşumunu sağlarlar. PDI ailesi üyeleri, aktif bölgede Cys-X-X-Cys motifleri içeren en az bir tiyoredoksin benzeri alanın varlığı ile tanımlanır. Bugüne kadar, çözünebilir ve transmembran proteinleri içeren de dahil olmak üzere yaklaşık 20 PDI ailesi üyesi tanımlanmıştır ve bunların çoğunun vücutta bütün dokularda eksprese edildiği anlaşılmıştır (Ellgaard ve Ruddock, 2005).

Post-translasyonel modifikasyonlar ve katlanmanın gerçekleşmesinden sonra proteinin kontrolü gerçekleşir. Bu kontrol ERAD ile meydana gelmektedir.

1.2.4. ER ile İlişkili Protein Degradasyonu (ERAD)

Proteinlerin bir kısmı doğal ve fonksiyonel forma ulaşmaz veya yanlış katlanır ya da kümelenebilir. Bu proteinler ya ER'de kalır ya da proteazomun aracılık ettiği ERAD yoluna girebilir ve ERAD ile degradasyonu gerçekleşir. Bu olay üç adımda gerçekleşir:

1. Tanıma ve hedefleme (ER içinde substrat tanıma ve retrotranslokasyonu hedefleme),
2. Retrotranslokasyon (ER'den sitozole substrat iletimi),
3. Degradasyon (ubikitin – proteazoma bağlı degradasyon) (Hegde ve Ploegh, 2010).

1. Tanıma ve Hedefleme

Yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ERAD aracılığıyla gerçekleşir. ERAD'ın substratları nasıl tanındığı ve doğru katlanmış proteinlerden veya katlanma sürecinde olanlardan ayırt etmesinin mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir (Braakman vd., 1991). Bu konuda verimli katlanmanın tek bir özellikle tanımlanamayacağını, bunun yerine protein stabilitesi, katlama hızı, enzim dağılımı ve metabolizma (redoks durumu, kalsiyum akışı, vb.) gibi ERAF (ER ile ilişkili katlama) olarak adlandırılan bir model ile olabileceği düşünülmektedir (Sekijima vd., 2005). Bu nedenle, proteostaz (protein homeostazı) olarak kavramsallaştırılan protein kalite kontrolü, konformasyonel olgunlaşma (ERAF) ile ERAD arasındaki teleolojik ilişki ile sürdürülür ve böylece yeni sentezlenen proteinlerin doğal yapısı bu proteinlerin elde edilme olasılıklarını belirler (Brodsky, 2007; Wiseman vd., 2007; Hutt ve Balch, 2010).

Tanınan proteinin sitoplazmada degrade olması için ubikuitin ligazların ve diğer adaptör proteinlerin aracılık ettiği ubikütinasyon gereklidir. Ubikütinasyonda görev alacak

1. ERAD-C (sitozol),
2. ERAD-M (membran), ve
3. ERAD-L (lümen) olmak üzere üç farklı ERAD vardır.

Bunun nedeni ERAD mekanizmasının proteinin yapısı ve işlevine göre değişkenlik göstermesidir (Taxis vd., 2003; Vashist ve Ng, 2004; Carvalho vd., 2006). Lümeninde bulunan yanlış katlanmış alanlara sahip proteinler, Hrd1/Hrd3 ubikuitin ligazları, Derlin-1 ve bağlayıcı protein Usa1p içeren ERAD-L kompleksi tarafından etiketlenir. Yanlış katlanmış

intramembran alanlara sahip proteinler ise Der1p veya Usa1p içermeyen ERAD-M tarafından işaretlenir. Yanlış katlanmış sitozolik alanlara sahip proteinler ise Doa10p ubiquitin ligaz, UBX2 ve p97 içeren farklı bir kompleks olan ERAD-C tarafından etiketlenmektedir (Carvalho vd.,2006; Denic vd.,2006).

ERAD'da, N-glikosile edilmiş proteinlerin degradasyonu iyi bir şekilde gerçekleşir. Daha önce bahsedildiği gibi, N-glikanın yapısı, protein katlanmasının durumu hakkında gerekli bilgileri taşır. CNX/CRT, monoglukosile edilmiş oligosakaritleri (GlcMan₉GlcNAc₂) tanır ve CNX/CRT döngüsü katlamayı sürdürür ve olgunlaşmamış glikopolipeptitleri ERAD'dan korur. Glikozile olmayan proteinler için, tanıma mekanizması glikozile edilmiş proteinlerinkinden biraz farklıdır. Glikozillenmemiş proteinlerin katlanmamış bölgeleri, çoğunlukla GRP78 olmak üzere ER şaperonları tarafından tanınır (Araki ve Nagata, 2011). Tanınan proteinler bir sonraki adım olan retrotranslokasyon ve degradasyon süreçlerine geçerler.

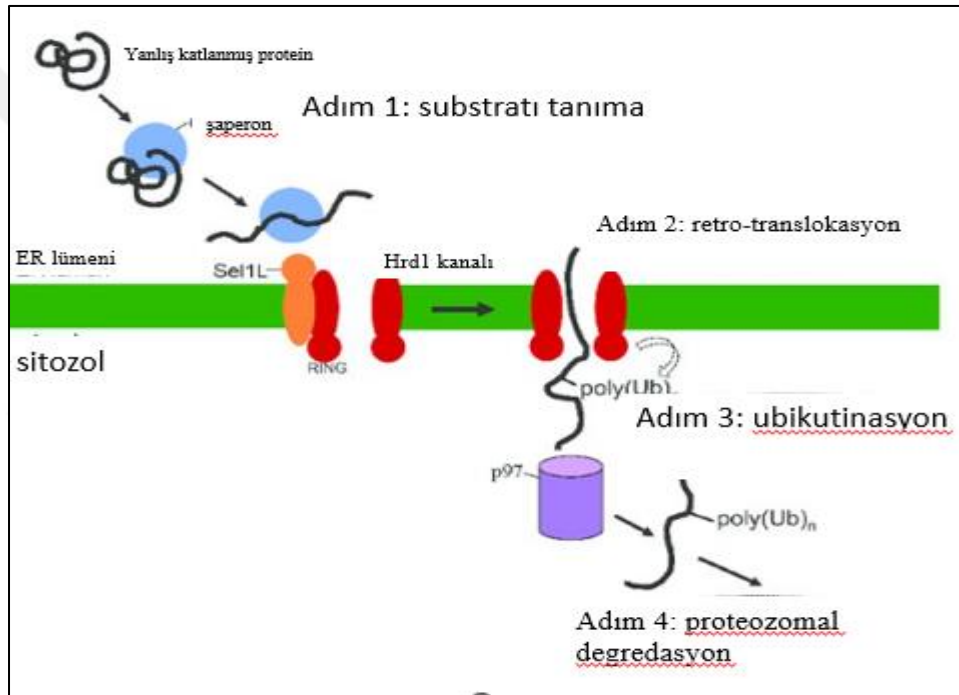
2. Retrotranslokasyon ve Degradasyon

Substratların tanınması ve hedeflenmesinden sonra, tanınan proteinler 26S proteazomları tarafından proteolize uğratılmak üzere sitozole gönderilmeleri için retrotranslokasyonları olmalıdır. Retrotranslokasyon kanalını oluşturan bileşenler belirsiz olsa da olası moleküller olarak Sec61 kompleksi ve Derlin-1 öne sürülmektedir (Willer vd., 2008; Schafer ve Wolf, 2009). Sec61 kompleksinin, proteazom, TRAP kompleksi, STP, PDI ve BAP31 dahil olmak üzere çeşitli ERAD substratları ve ERAD yolları ile etkileşimde olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2010). Derlin-1'in ise Sec61a'dan bağımsız olan substrat dislokasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Wahlman, 2007).

Bunların dışında E3 ligaz kompleksleri de organize kompleksler içindeki ERAD substratlarını verimli bir şekilde tanıyabilir, hedefleyebilir ve retrotranslokasyon yapabilirler (Bagola vd., 2011).

Ubikütinasyon, substratların proteazoma verimli bir şekilde iletilmesini sağlayan sitozolde gerçekleşir. ERAD substratları, serin/treonin kalıntılarında ve daha az sıklıkla lizin kalıntılarında bulunur (Shimizu vd., 2010). ERAD kompleksinin sitozolik yüzünde bulunan AAA+ ATPaz p97/VCP heksameri, substratı sitozole çekecek şekilde yönlendirir (Chapman vd., 2010).

Ubikütinlenen substratlar, poliubikütin zincirlerine ve proteazoma bağlanan UBA ve UBL alanları içeren HR23A/B veya Ubiquilin-1 olarak bilinen proteinler tarafından proteazoma aktarılır ve böylece proteazomda parçalanırlar (Lim vd., 2009).



Şekil 8. ERAD mekanizması (Dupzyk ve Tsai, 2016).

1.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücre içinde meydana gelen birçok bozulma ER işlevini değiştirebilir ve yanlış katlanmış proteinlerin anormal birikimine yol açabilir. ER stresine yol açan hücre içi bozulmalar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir;

- a) Hastalıkla ilgili mutant protein ekspresyonlarında artış,
- b) Endokrin ve ekzokrin hücrelerin salgı profilinde bozulma,
- c) Viral enfeksiyonlara bağlı üretilen proteinlerin aşırı yüküne maruz kalma,
- d) Kalsiyuma bağımlı şaperonları etkileyen kalsiyum homeostazında bozulma.

ER'de ERS ortaya çıktığında, UPR denilen protein katlama değişiklikleriyle başa çıkmakla görevli sinyal yolu aktive olur. UPR yolağının aktive olması ile ER lümenindeki protein katlanma durumu hakkındaki bilgi hücre sitozolüne ve nükleuse iletilir. Böylelikle ER ile hücre arasında protein katlanma durumunu gösteren bir iletişim sağlanmış olur. Bu bilgi aktarımı sayesinde yeni duruma karşı adaptif yanıtların gelişmesi sağlanır (Ron ve Walter,2007). Bu adaptif yanıtlar ER içinde olabileceği gibi hücre sitoplazmasına iletilen sinyaller vasıtası ile hücre işlevlerinde bazı değişiklikler şeklinde de ortaya çıkabilir. UPR sinyali, ER ve diğer organellerin biyogenezini arttırır, katlama ve kalite kontrol mekanizmalarını gen ekspresyonu seviyesinde geliştirir ve protein translasyonunu ayarlar. Bununla birlikte, uzun süreli ve yüksek düzeydeki ERS hücre ölümüyle sonuçlanır. Hücrenin hayatta kalması veya apoptoza gitmesi stres uyarılarının süresi ve yoğunluğuna bağlı olarak UPR stres sensörlerine gelen uyarılar tarafından düzenlenir (Dufey vd.,2014).

UPR sinyal yolağının aktivitesi bazı hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Bunun nedeni UPR sinyal yolağının lipid metabolizması, glukoz homeostazisi, edinsel bağışıklık ve hücre farklılaşması gibi birçok fizyolojik süreci farklı mekanizmalar üzerinden düzenleyebilmesidir (Rutkowski ve Hedge, 2010). UPR sinyal yolunun oluşan ERS'ye karşı yeterli etkinliği gösterememesi durumunda ise hücre apoptoza gidebilir. Bunun sonucunda ER proteostazının aksamasına bağlı olarak metabolik, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar ortaya çıkabilir. Bu bulgular, çeşitli hastalıkların tedavisinde ERS'yi bir hedef haline getirmiştir (Hetz vd.,2013). Bununla beraber UPR sinyal yolağının hastalıklardaki rolünün belirlenmesi de önem kazanmıştır.

1.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

Ökaryotik hücrelerde oluşan ERS'ye karşı koruyucu ve ERS'nin üstesinden gelme amacıyla oluşan tepkilerin tamamı hücre içi bir kaskat olan UPR ile gerçekleşir. UPR aktivasyonu sonucu hücre şu yanıtları verebilir:

- a) Protein sentez hızını azaltabilir,
- b) Polipeptit agregasyonunu önleyen proteinleri ve şaperonları kodlayan genlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyebilir,
- c) Birikmiş yanlış katlanmış proteinleri degrade edebilir (Ghemrawi ve Khair, 2020).

Bu yanıt mekanizması ise üç ana sensör tarafından kontrol edilir (Şekil 9). Bunlar;

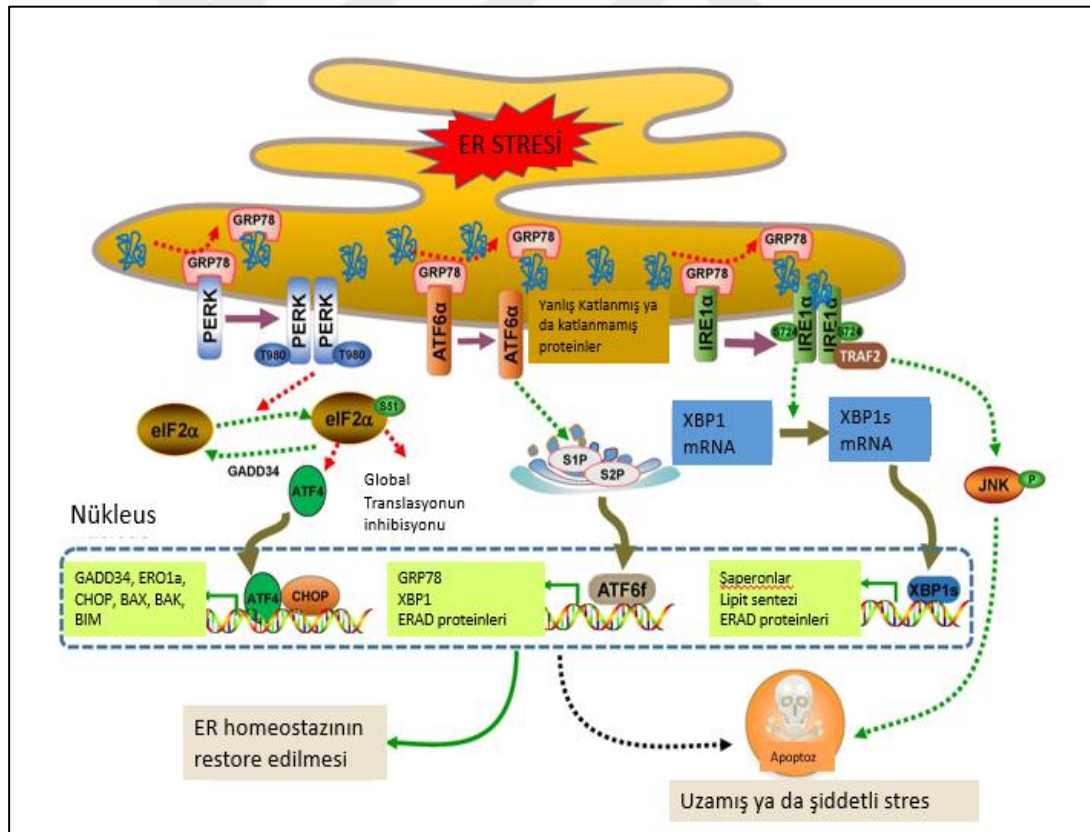
1. İnositol gerektiren enzim-1 (IRE1),
2. Protein kinaz RNA ile aktive olan (PKR) benzeri ER kinaz (PERK)
3. Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6).

Yukarıda belirtilen her üç ERS sensörü de ER lümeninde lokalizedir. Bu sensörler ER stresinin olmadığı durumlarda ER lümeninde yerleşik bir şaperon olan ısı şoku proteini A5 (GRP78) bağlı olarak bulunurlar. Bu sensörler GRP78'e bağlı oldukları müddetçe inaktiftirler (Bertolotti vd., 2000; Shen vd., 2002).

ER lümeninde biriken yanlış katlanmış protein birikimi her üç sensörün de GRP78'den ayrılmasını sağlar. GRP78'in IRE1 ve PERK sensörlerinden ayrılmasıyla bu sensörler homodimerize, oligomerize ve trans-otofosforile olarak aktif hale gelir (Bertolotti vd.,2000). Buna karşılık, GRP78'in diğer bir sensör olan ATF6'dan ayrılması ile ATF6 ER'den çıkıp golgi aygıtına gider. Bu amaçla ER'den çıkabilmek için ilk olarak intermembranel proteoliz işlemine tabi tutulur. ER'den çıktıktan sonra golgi aygıtına ulaşır

ve burada değişikliğe uğrar. Aktive olmuş şekilde golgiden çıkarak nükleusa gider ve UPR yanıtını uyarır. Her üç sensör de UPR'yi uyararak ER homeostazının korunmasında rol oynarlar. Yanlış katlanmış proteinlerin aşırı veya uzun süreli birikimi, UPR'nin yetersiz kalmasına ve sonuç olarak hücrenin ölümüne gitmesine yol açar (Ghemrawi ve Khair, 2020).

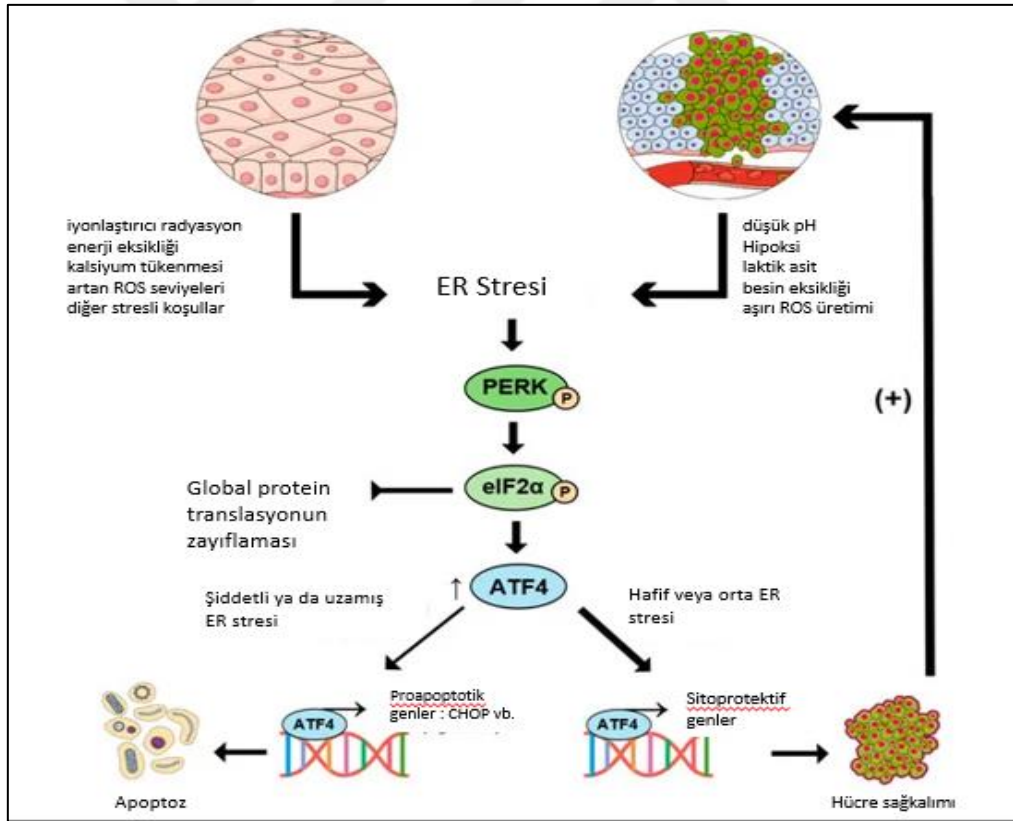
UPR yolağını aktive eden sensörlerden biri olan PERK son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Özellikle nörolojik hastalıklar ile PERK ilişkisi yoğun bir şekilde araştırılmaya devam etmektedir. Bu hastalıklardan biri olan SAK ile PERK ilişkisini ortaya koyan çalışmalar bulunmasının yanı sıra PERK yolağının inhibisyonunun SAK tedavisinde hedef yollardan biri olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Shao vd., 2018; Yan vd.,2017; Zhao vd., 2017; Chen vd., 2020; Senol vd.,2021). Bu nedenle çalışmamızda SAK'ta ortaya çıkacak ERS'ye karşı PST'nin koruyucu etkilerini araştırmak için PERK yolağı seçilmiştir.



Şekil 9. Katlanmamış protein yanıtı (Ren vd., 2021).

1.3.2. PERK Sinyal Yolağı

PERK, ER stresini algılayan ve bir sitoplazmik serin/treonin protein kinaz alanı içeren ER'de yerleşik bir tip I transmembran proteindir. IRE1 gibi, PERK de normal koşullar altında şaperon protein olan GRP78'e bağlanmış bir şekilde ER lümeninde bulunur. Katlanmamış proteinler ER stresi sırasında biriktikçe, GRP78 ER lümeninden ayrılır ve bu durum PERK'in oligomerizasyonuna, trans-otofosforilasyonuna ve sonuç olarak aktivasyonuna neden olur. PERK aktivasyonu, ökaryotik translasyon başlatma faktörü a (eIF2a) alt biriminin fosforilasyonunu tetikler. Fosforillenmiş eIF2a (p-eIF2a), global protein sentezini azaltır ve translasyon başlatma kompleksinin ilk uORF'sinde (yukarı akış açık okuma çerçevesi) daha uzun kalma süresi nedeniyle ATF4'ün translasyonunu uyarır. Bir transkripsiyon faktörü olan ATF4, proapoptotik faktör olarak davranır ve CHOP vb. apoptoz ile ilgili genleri yukarı doğru düzenler (Hu vd., 2019; Şekil 10).



Şekil 10. PERK sinyal yolağı (Siwecka vd., 2019).

Hücre apoptozunu indüklemekte önemli bir yolak olan PERK/ATF4/CHOP sinyal yolu son yıllarda yapılan araştırmalarla ön plana çıkmaktadır. PERK/eIF2a sinyal yolu hiperaktivitesinin, global protein sentezini azaltıcı etkisinin hastalıklara ve nöronal kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. PERK/eIF2 α düzeylerinin, serebral iskemide (Gharibani vd., 2015), travmatik beyin hasarında (Rubovitch vd., 2015) ve subaraknoid kanamada (Yan vd., 2017) önemli ölçüde arttığını gösteren deneysel çalışmalar bulunmaktadır. SAK'ta ERS'nin arttığının ortaya çıkması ERS'yi bloke eden ajanların etkilerinin araştırılmasına yol açmıştır. Bu amaçla farelerde yapılan deneysel bir çalışmada bir ERS blokörü olan TUDCA (tauroursodeoksikolik asit) uygulanmıştır. TUDCA uygulamasının SAK kaynaklı ERS'yi azalttığı, serebrovasküler disfonksiyonu iyileştirdiği ve SAK'a bağlı EBH'yi hafiflettiği ortaya konulmuştur (Chen vd., 2020). Başka bir çalışmada Sprague-Dawley sıçanlarda atorvastatin uygulamasının SAK sonrası ortaya çıkan EBH'de ERS araştırılmıştır. Atorvastatinin erken dönemde uygulanmasının SAK'tan 24 saat sonra beyin su içeriğini ve apoptozu azalttığı belirlenmiştir. Atorvastatinin ayrıca apoptozla ve ERS ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde azaltarak SAK bağlı apoptozu ve ERS'yi azaltıcı etki gösterdiği de gözlenmiştir (Qi vd., 2018). Bu bulgular SAK'ın da dahil olduğu sinir hücrelerinde hasara sebep olan birçok beyin hastalığında ERS'nin de rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ERS'yi azaltıcı ajanların EBH'yi azaltıcı etkileri oldukça önemli hale gelmiştir.

SAK'ta ERS'yi azaltıcı ajanların etkileri bilindiği halde PST'nin SAK'a ERS üzerine olan etkileri konusunda çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte PST'ye yapı olarak benzerlik gösteren RES'in SAK'ta ERS'yi azalttığını gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada RES uygulamasının sıçanların prefrontal korteksinde NRF-2 (Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) ve HO-1 (heme oksijenaz-1) ekspresyonunu arttırdığı, reaktif oksijen türevleri (ROS) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azalttığı belirlenmiştir. RES uygulaması aynı zamanda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonlarını da önemli ölçüde azaltmış ve SAK sonrası inflamatuvar yanıtı baskılamıştır. RES uygulanan grupta daha düşük nöronal apoptoz, beyin ödemi ve nörolojik defisit belirlenmiştir. Bu sonuçlar RES'in yukarıdaki etkileri ile ilişkilendirilmiştir (Xie vd., 2019). Farklı bir çalışma ise RES sıçanlara tioredoksin etkileşimli protein (TXNIP) mRNA ve protein ekspresyonunu baskılamak amacı ile uygulanmıştır. TXNIP nöroinflamasyon ve apoptozu aracılık ederek SAK sonrası EBH'ye katkıda bulunduğu düşünülen bir moleküldür.

RES uygulanarak oluşturulan TXNIP'nin inhibisyonunun SAK kaynaklı inflamasyonu ve hücre apoptozunu hafiflettiği ve bazı prognostik göstergeleri zayıflattığı gösterilmiştir (Zhao vd., 2017).

RES'in başka organ ve dokularda ERS'yi düzenlemesindeki rolü ortaya konulmuş ve oldukça iyi bilinmektedir. RES'in ERS'yi azaltıcı etkilerini over granüloza hücrelerinde inceleyen bir çalışma polikistik over sendromunda RES'in, UPR sürecinde yer alan genlerin ekspresyonunu değiştirerek granüloza hücrelerinde ERS'yi modüle edebileceği göstermiştir (Brenjian vd., 2019). Başka bir çalışma ERS'nin, retinada vasküler dejenerasyona önemli bir katkıda bulunduğunu ve RES'in, iskemik/reperfüzyon hasarını ve tunikamisin kaynaklı vasküler dejenerasyonu ERS'yi inhibe ederek baskıladığını ortaya koymuştur (Li vd., 2012). Diğer bir çalışmada ise, farelerde RES uygulamasının in vivo renoprotektif etkiler ile in vitro yüksek konsantrasyonlu glukoz kaynaklı tübüler hücre apoptozunu azaltıcı etkiler gösterdiği ve ERS'yi baskıladığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2020).

RES'in ERS üzerine etkileri gerek SAK'ta ve gerekse diğer organlarda biliniyor olmasına rağmen PST ile ERS ilişkisini inceleyen çalışmalar ise sınırlıdır. Bu çalışmalardan biri PST'nin bir ERS indükleyicisi olan Hcy'nin (homosistein) yüksek konsantrasyonunun neden olduğu endotelial hücre apoptozunu, ROS oluşumunu ve ERS'yi azaltabileceğini göstermiştir (Kil vd., 2017). Bununla birlikte bu çalışmalarda ERS ile PST ilişkisi ortaya konulmuş olmasına rağmen PERK yolağının rolü konusunda çok az bilgi bulunmaktadır.

SAK'ta PERK yolağı inhibisyonunun tedavi seçenekleri arasında düşünülüyor olması bu çalışmada bizleri PST'nin SAK'ta PERK üzerine etkilerinin araştırılmasına yönlendirmiştir.

1.4. Apoptoz

Apoptoz, “programlanmış” hücre ölümü olarak tanımlanır. Apoptoz, normal şartlarda gelişme ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücreleri korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptozu uyaran fizyolojik ve patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak her zaman apoptoza gitmezler.

SAK sonrası ortaya çıkan EBH'nin potansiyel mekanizmaları nöronal apoptoz, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve kan beyin bariyerinin yıkımını içerir (Zhu vd., 2018). SAK sonrası kortikal, subkortikal veya hipokampal nöronlarda ve endotelde apoptoz görülebilir (Prunell vd., 2003; Endo vd., 2006; Chung vd., 2022). Apoptoz inhibisyonunun SAK sonrası nöroprotektif bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle SAK sonrası EBH'nin önlenmesi ve tedavisinde apoptoz önemli bir hedef haline gelmiştir (Zhao vd., 2022).

Bu amaçla birçok farklı molekül kullanılmış ve etkileri incelenmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada erken dönemde fluoksetin uygulamasının, apoptozu ve apoptozla ilişkili proteinler olan sitokrom C, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu SAK'tan 72 saat sonra önemli ölçüde azalttığına dair kanıt sağlamıştır. Ayrıca fluoksetinin anti-apoptotik etkileri ve Notch1/ASK1/p38/MAPK sinyal yolağı aracılığıyla SAK sonrası EBH'yi iyileştirebileceğine dair verilere ulaşılmıştır (Liu vd., 2022). Başka bir çalışmada ise rekombinant osteopontin uygulaması SAK'tan 24 saat sonra otofajiyi aktive ederken, kaspaz-3 ve beclin-1 arasındaki etkileşimi düzenleyerek apoptozu azaltabileceği bulunmuştur (Sun vd., 2019). Farklı bir çalışma da ise tozasertib uygulamasının, SAK sonrası TUNEL (Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP nick uç etiketleme) pozitif nöron sayıları ile beyin ödemi azalttığı ve nörodavranışsal işlevlerde iyileşme sağladığı ortaya konulmuştur. Tozasertib ayrıca serebral kortekste SAK sonrası Bim, CC-9 ve CC-3 ekspresyonlarını da azaltmıştır. Tozasertibin nöroprotektif etkisine DLK/JIP3/MA2K7/JNK yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir (Yin vd., 2016). Diğer bir çalışmada ise RES'nin mortaliteyi, kanama miktarını ve beyin ödemi azalttığı ve SAK sonrası nöronal fonksiyonu iyileştirdiği bulundu. İyileşmedeki bu gelişmelere, Akt/mTOR sinyal yolu tarafından düzenlenen otofajinin artması ve apoptozun inhibisyonunun aracılık ettiği düşünülmektedir (Guo vd., 2018). Başka bir çalışmada, RES uygulamasının, SAK sonrası sıçanlarında beyin p-Akt seviyesini önemli ölçüde artırdığı ve nöronal apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2013).

Son yıllarda SAK'a bağlı EBH'nin patolojilerine ERS'de eklenmiştir. Nitekim, ERS'nin aşırı aktivasyonunun, inflamasyona ve apoptoza yol açan aşağı akış basamaklarını daha da tetikleyen kalsiyum salınımına ve oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir (Sprenkle vd., 2017).

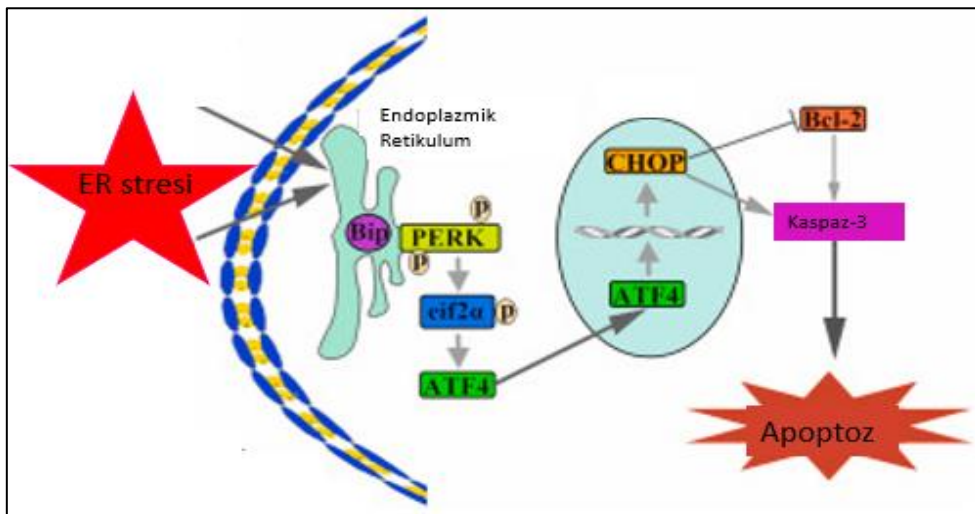
1.4.1. Endoplazmik Retikulum İlişkili Apoptoz

Son yıllarda SAK sonrası ortaya çıkan ERS araştırmacıların ilgisini çekmiş ve artan ERS'nin apoptozu tetikleyen bir faktör olduğu anlaşılmıştır. Orta düzeyde bir ERS yanıtı, protein sentezini azaltabilir, proteinlerin doğru şekilde katlanmasını sağlayabilir ve hücre içi Ca^{2+} homeostazını koruyabilir. Bununla birlikte, aşırı şekilde artan ERS yanıtı apoptoz sinyallerini tetikleyebilir ve apoptozu teşvik edebilir. UPR, ERS'yi yeterince azaltmazsa apoptoz meydana gelebilir (Oslowski ve Urano, 2011). Bu yanıtın ER homeostazını geri getirip getiremeyeceği, stres uyarısının yoğunluğuna ve süresine bağlıdır. Uyarı çok güçlüyse veya çok uzun sürerse bununla beraber ER homeostazını yeniden sağlamak ve sürdürmek için uyarılar yeterli değilse, hücre apoptozu gidebilir (Sprenkle vd., 2017).

Hücrelerde ERS kaynaklı apoptoz 3 farklı yolak tarafından uyarılabilir. Bunlar;

- IRE1a/c-Jun N-terminal kinaz (JNK),
- PERK/eIF2a/CHOP,
- ATF6/CHOP'dur (Doyle vd., 2011; Xu vd., 2018).

Bu yollardan PERK/eIF2a/ATF4/CHOP sinyal yolağının SAK'tan sonra etkinleştiği ve apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Bu nedenle SAK'ta bu yolağın ilişkisi oldukça ön plana çıkmıştır (şekil 11).



şekil 11. ER ilişkili apoptoz ve PERK sinyal yolağı (Liu vd., 2021).

1.4.2. PERK Sinyal Yolağı ve Apoptoz

ERS koşulları altında, PERK'in aktivasyonundan sonra, PERK tarafından eIF2 α 'nın fosforilasyonu gerçekleşir. eIF2 α 'nın fosforile olması, pro-survival yanıt olarak genel translasyonun inhibisyonuna neden olur. Protein translasyonunun inhibisyonu, ER'ye gelen yeni oluşan proteinlerin yükünü azaltarak hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur.

PERK sinyal yolağı otofaji, ATF4 aracılı transkripsiyon yolağı, protein katlanması ve redoks metabolizması gibi önemli mekanizmaları düzenler. Farklı hücre tiplerinde, kronik stres koşulları altında PERK sinyal yolu aracılığı ile hücre ölümünün indüklendiği gösterilmiştir. Hücre ölümünü başlatan anahtar molekül CHOP'tur. PERK aktivasyonu eIF2 α fosforilasyonunu indükler ve bu da CHOP ekspresyonunu artıran ATF4'n seçici transkripsiyonunu uyarır (Koumenis vd., 2022).

PERK^{-/-} fare embriyonik fibroblastları ERS'yi indükleyen ajanlarla uyarıldığında, protein translasyonunu inhibe edici etkinin ortaya çıkmadığı ve hücre ölümünde artış gözlendiği belirlenmiştir. Çalışmada translasyonun sikloheksimit ile inhibe edilmesi, ERS'nin neden olduğu hücre ölümünü azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar katlanmamış protein birikiminin inhibe edilmesi şeklinde ortaya çıkan yanıtın hücrenin hayatta kalması için çok önemli olduğunu göstermiştir (Harding vd, 2000).

Bu yolağın öneminin açığa çıkması ile PERK sinyal yolağının aktivitesinin azaltılarak ERS'nin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla salubrinol, tetrametilpirazin, TXNIP gibi çeşitli biyolojik moleküller kullanılmıştır (Yan vd., 2017; Shao vd., 2018; Zhao vd., 2017). Bu moleküller arasından ise RES oldukça ön plana çıkmıştır (Zhao vd., 2017). Bu nedenlerle alışmamızda RES analogu olan PST tercih edilmiştir.

1.4.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

Rel ailesi NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel'den oluşan bir protein ailesi olup NF- κ B bu ailenin bir üyesidir (Simpson vd., 1999). Bu proteinler çoğu hücre tipinin sitoplazmasında inhibitör proteinler tarafından tutulmaktadır. NF- κ B'da I κ B

olarak adlandırılan protein ile inhibe haldedir. Çok çeşitli uyaranlara yanıt olarak, İkB inhibitörü hızla fosforile olur, parçalanır ve NF-κB'den ayrılır. Bunun sonucunda NF-κB'nin inhibisyonu ortadan kalkarak aktifleşir. Bu aktifleşme ile NF-κB proteinleri nükleusa transloke olur ve DNA'ya dimer olarak bağlanır. Böylelikle hedef genlerin transkripsiyonu başlar (Liu vd., 2017). Bu transkripsiyon ile NF-κB hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, inflamasyon ve bağışıklık tepkileri gibi çeşitli hücre süreçlerinde yer alan 100'den fazla geni etkileyebilmektedir (Ghosh ve Karin, 2002; Şekil 12).

NF-κB'nin oluşturduğu yanıtlar genellikle inflamasyonla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen apoptoz yanıtı da oldukça önem arz etmektedir. Buna ek olarak son yıllarda NF-κB ve ERS ilişkisi de bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. NF-κB aktivasyonu ile ERS sırasındaki bu ilişkinin kalsiyum salınımı, ROS üretimi, IRE1 ve PERK sinyal yolu aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Yoshida vd., 2001; Mak vd., 2008). Ayrıca yapılan çalışmalarda kaspaz-12/kaspaz-4, CHOP/GADD153, IRE1/PERK/JNK ve p53 sinyal yollarının da doğrudan dahil olduğu birçok yolda ERS'nin neden olduğu apoptozla ilişkilendirilmiştir (Nakagawa ve Yuan., 2000; Marciniak vd., 2004; Urano vd., 2000; Li vd., 2006).

NF-κB aktivitesi SAK çalışmalarında da öne plana çıkmaktadır. Tavşanlarda SAK modellemesi yapılan bir çalışmada NF-κB aktivitesindeki zamana bağlı değişiklikler incelenmiştir. NF-κB aktivitesinin SAK'tan sonraki 1. ve 3. günlerde beyin korteksinde arttığını belirlemiştir. Bununla beraber SAK'tan sonraki 5. ve 7. günlerde ise başlangıç seviyesine döndüğü ortaya koyulmuştur. Ayrıca, NF-κB aktivitesinin SAK sonrası 10. günde ikinci kez önemli ölçüde yükseldiği gözlemlenmiştir (You vd., 2016)

SAK ile NF-κB ilişkisine ek olarak hem RES'in hem de PST'nin farklı deneysel modellerde NF-κB ile ilişkisi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Sıçanlarda miyokardiyal sepsis modelinde, NF-κB proteini ve inflamatuvar faktörler olan TNF-α, IL-6, IL-1β ve TLR4'ün ekspresyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, RES'in bu parametreleri önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Shang vd., 2019). PST ve NF-κB ilişkisini araştıran bir hücre kültürü çalışmasında ise PST'nin ROS/NF-κB sinyal yolağını inhibe ederek endotelial bariyer hasarını azaltıcı etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Wang vd., 2022). Başka bir hücre hattı çalışmasında ise PST'nin NF-κB gen ekspresyonunu, İkB

fosforilasyonunu, p65 fosforilasyonunu baskıladığı ifade edilmiştir (Ashikawa vd., 2015). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda PST'nin SAK üzerine olan etkileri NF-κB üzerinden de değerlendirilmiştir.

1.4.4. p53

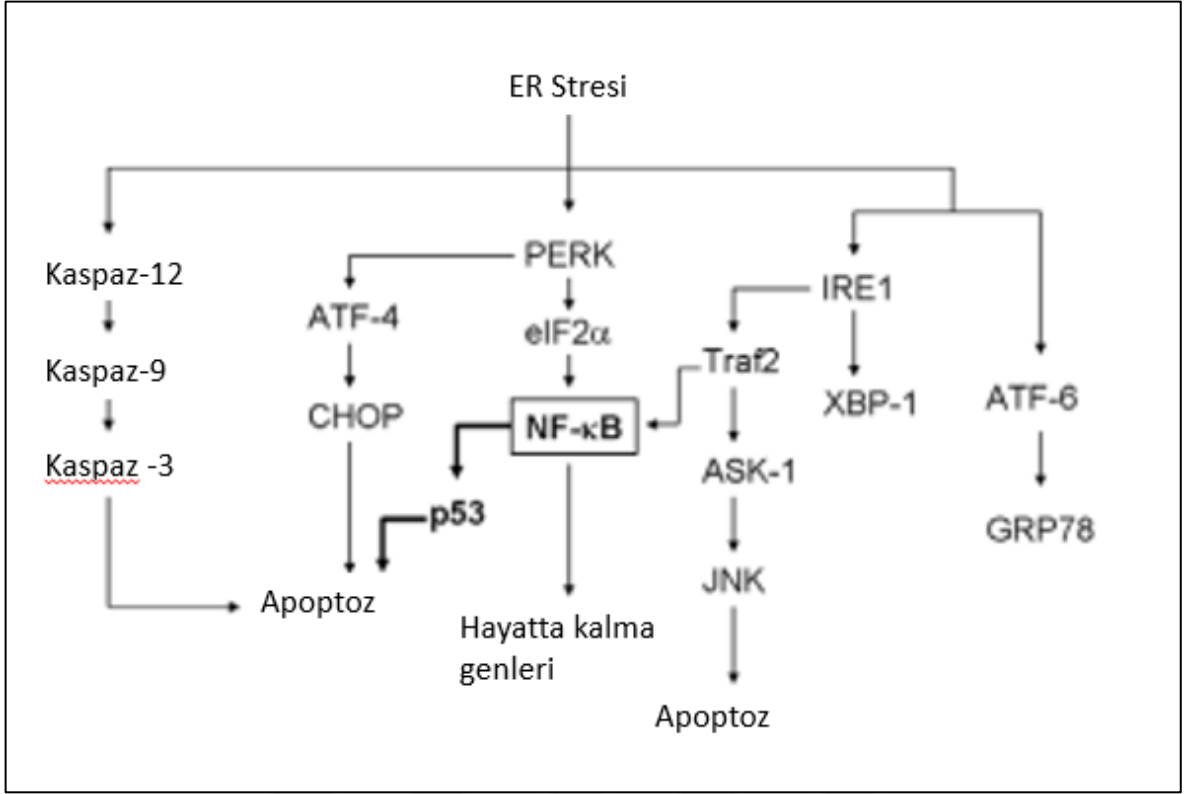
p53, tümör büyümesi sırasında hücre döngüsünü, DNA replikasyonunu ve kontrolsüz hücre bölünmesini kontrol eden bir tümör baskılayıcı proteindir (Luo vd., 2017). Bu işlevlerine ek olarak p53'ün iskemi, kanama, hipoksi ve şiddetli DNA hasarına yanıt olarak apoptoz sürecinin oluşturulmasında görev alan en önemli faktörlerden biri olduğu ifade edilmektedir (Culmsee ve Mattson, 2005; Chai vd., 2022).

Gao vd. (2009) yılında yaptıkları çalışmada SAK'ta p53 aktivitesinin SAK'tan hem 24 saat hem de 72 saat sonra arttığını ortaya koymuştur. Bununla beraber p53'ün inhibe edilmesi ise beyin hasarını ve nöronal hücre ölümünü azalttığını belirlemişlerdir (Gao vd., 2009). p53 bu işlevlerine ek olarak SAK'ta apoptozda da rol oynamaktadır (Li vd., 2010; Şekil 12). Ayrıca, SAK sonrası sıçanların baziller arter endotel hücrelerinde apoptoz ve p53 ekspresyon seviyeleri belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir (Li vd., 2016). Başka bir deneysel çalışmada ise SAK modellemesi yapılan sıçanlara p53 inhibitörü olan pifithrin-α verildiğinde mikroRNA-22 ekspresyonunun azaldığı ve Bax protein ekspresyonunun da inhibe edildiği bildirilmiştir (Yu vd., 2018).

Yapılan çalışmalarda ERS sırasında p53'ün önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. ERS sırasında p53 gen ekspresyonunun artması tanımlanmış olmasına rağmen, p53 gen ekspresyonunun ER stresine yanıt olarak düzenlenip düzenlenmediği ve nasıl düzenlendiği henüz açık değildir. ER disfonksiyonu birçok hastalıkla bağlantılı olduğundan, ERS sırasında p53 ekspresyonunu da araştırılması önem arz etmektedir.

PST'nin de p53 üzerine etkisi mevcuttur. Yapılan bir çalışmada sisplatinin oluşturduğu apoptotik etki PST ile düzenlenmiştir. Bu çalışmada PST'nin anti-apoptotik etkisini p53 üzerinden de gösterdiği ifade edilmektedir (Wahdan vd., 2019).

Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda p53'ün ERS üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir.



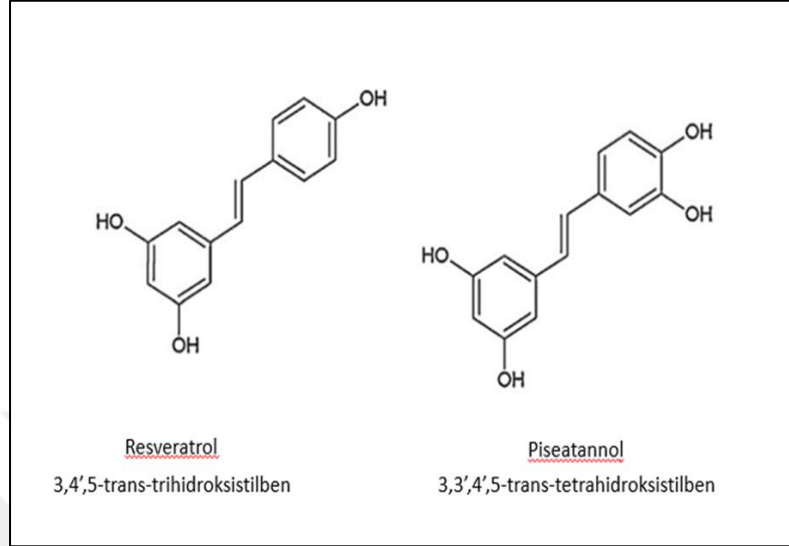
Şekil 12. NF-κB ve p53'ün ER aracılı apoptoz üzerine etkisi (Lin vd., 2012).

SAK, apoptozu indüklemek için ERS'yi çeşitli şekillerde aktive eder. Bu aktivasyonun azaltılarak apoptozun engellenmesi SAK'a bağlı EBH'nin azaltılması açısından önemlidir. Bu sayede ilerleyen dönemlerde gerçekleşecek hücre ölümlerinin engellenmesi bireylerin sağkalımının artırılmasına ve sağkalım sonrası hastalığın prognozunun iyileştirilmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle SAK'ta ERS'yi inhibe edecek potansiyele sahip moleküllerin incelenmesi gereklidir. Bu moleküllerden biri ise PST'dir.

1.5. Piseatannol

Resveratrol (3,40,5,-trans-trihidroksistilben), en sık çalışılan doğal polifenolik bileşiklerden biri olan bir stilbendir. Yapılan çalışmalar ile RES'in, anti-trombosit, anti-karsinojenik, anti-enflamatuar, anti-oksidan, anti-hiperlipidemik, vazorelaksant, immünomodülatör ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere bir çok terapötik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu yararlı özellikleri sayesinde, yeni, daha etkili analogların aranması araştırmacılar için RES'i önemli hale getirmiştir. RES'in zayıf biyoyararlanımı, hızlı metabolizması klinik veya diyet kullanımını sınırlamaktadır. Bu sebeple RES yerine

analogları veya metabolitleri, son yıllarda artan bir ilgi görmektedir. Bu analoglardan biri ise PST'dir (Rossi vd., 2008).



Şekil 13. RES ve PST molekül yapısı (Piotrowska vd., 2012).

Piceatannol (3,4,30,5-transtrihidroksistilben) 3. pozisyonda ek bir fenolik grup bulunan bir RES analogudur. Üzüm, yer fıstığı, şeker kamışı, beyaz çay ve çarkıfelek meyvesi tohumları gibi çeşitli bitkilerde bulunan ve doğal olarak oluşan bir stilben olan PST, RES ile yapısal benzerliğe sahiptir. Bu nedenle PST, RES benzeri biyolojik aktiviteler sergilemektedir. PST, anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-oksidan, kardiyoprotektif, anti-diyabetik, nöroprotektif ve immünomodülatör gibi birçok biyolojik işleve sahiptir (Piotrowska vd.,2012).

Sahip olduğu bu özellikler ile dikkat çekici haline gelen PST'nin çeşitli durumlar ve hastalıklarla ilgili bir çok çalışmada etkinliği değerlendirilmiştir. Ancak PST'nin SAK üzerine etkilerini değerlendiren çalışma oldukça azdır. Bununla beraber bildiğimiz kadarıyla bu etkileri ERS ve ERS üzerinde etkili olan PERK/eIF2a/ATF4/CHOP yolağı üzerinden değerlendiren bir çalışma mevcut değildir. Yukarıda verilen bilgilerden yola çıkarak çalışmamızın amacı SAK modeli geliştirilen sıçanlarda PST'nin ERS üzerine etkilerini çeşitli parametreler aracılığıyla değerlendirmektir.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Subaraknoid kanamalar, anevrizma rüptürü veya travmatik kafa travmasından kaynaklanabilir ve araknoid membran ile beyni çevreleyen pia mater arasındaki subaraknoid boşlukta kanamaya neden olur. Hızlı tedavi gerektirir ve genellikle ciddi bir tablo ile seyrederek. Altta yatan bir anevrizmanın neden olduğu subaraknoid kanama ile başvuran hastaların yaklaşık yarısı 30 gün içinde ölür ve hayatta kalanların üçte birinde işlev kayıpları meydana gelir.

Yaygın görülmesine ve ciddi seyretmesine rağmen SAK'ın kesin bir tedavisi yoktur. Bu sebeple SAK kaynaklı ölüm oranının azaltılmasına, işlev kayıplarının önlenmesine, altında yatan mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasına ve SAK sonrası iyileşmeyi hızlandırıcı ajanların geliştirilmesine yönelik deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SAK'ı takiben EBH, nörolojik sonuçlara ana katkıda bulunduğu kabul edilmiştir. Son çalışmalar, oksidatif hasarın ve ERS'nin EBH'nin patogeneze katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, anti-oksidatif stres veya anti-endoplazmik retikulum stres müdahalesi, EBH için etkili bir terapötik strateji olabilir. ERS'nin endotel hücrelerinin apoptozisine ve KBB'nin bozulmasına kadar gidebilen apoptotik süreçleri başlattığı da ortaya konulmuştur. Bu nedenle SAK'ta ERS'yi azaltmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde SAK'da etkili tedavi yöntemleri konusunda birçok molekül üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Piseatannol bu aday moleküllerden bir tanesidir. Piseatannolün anti-inflamatuar, antioksidatif, anti-proliferatif aktivitelere sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada, PST'nin SAK patofizyolojisinde rol oynayan ERS üzerine etkilerinin ve SAK'a bağlı gelişen apoptozda ERS'nin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

2.1. Subaraknoid Kanama ve Piseatannol

Piseatannol ve SAK ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmaktadır. 2015 yılında yapılan çalışma ile ilk kez Mincle/Syk sinyal yolunun SAK sonrası doğuştan gelen bağışıklık yanıtı ve nöroinflamasyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir ve de PST'nin SAK'ta sonrası muhtemel koruyucu etkilere sahip olabilecek bir molekül olduğu söylenmiştir (He vd., 2015).



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından onay alındı (05.03.2021 toplantı tarihli ve 2021/02-08 sayılı karar) Çalışmanın hayvan deneyleri süreci Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM)'nde yürütüldü.

3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Çalışmada, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ÇOMÜDAM) temin edilen 24 adet 8-10 haftalık 200-300 g ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Tüm sıçanların deney aşamasından önce ayrı ayrı ağırlıkları ölçüldü uygun ağırlıkta sıçanlar çalışma için seçildi. Sıçanlar, deneysel süreçte yaklaşık olarak $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ad-libitum olarak beslendi.

Çalışmada kullanılan sıçanlar her grupta 8 sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Sıçanların gruplandırılması ve yapılan işlemler Tablo 1'de gösterildiği gibi yapıldı.

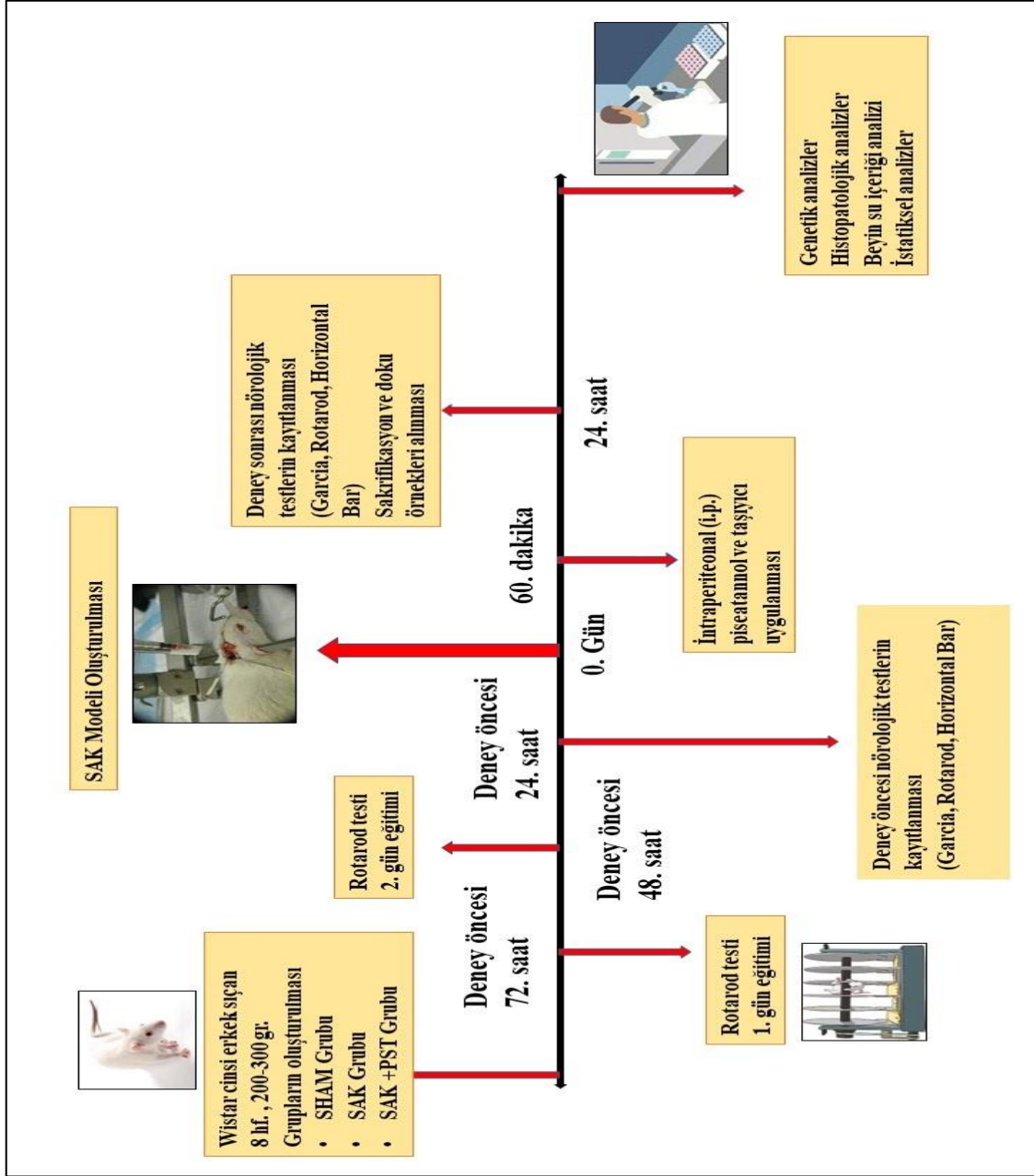
Tablo 1

Hayvanların gruplandırılması ve yapılan işlemler

Gruplar	Yapılan işlemler
SHAM Grubu (n=8)	SAK gruplarında yapılan kanama modeli aynı şekilde gerçekleştirildi aynı büyüklükteki bir iğne ile prekiazmatik sisternaya girildi diğer gruplardan farklı olarak kan verilmedi. İğne 10 saniye boyunca bekletildikten sonra çıkarıldı. Sıçanlara piseattanol içermeyen taşıyıcı solüsyon intraperitoneal yolla uygulandı.
SAK Grubu (n=8)	SAK modeli oluşturuldu. Kuyruktan 120 µl heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan alındı ve prekiazmatik sisternaya 10 saniye sürede enjekte edildi. Sıçanlara piseattanol içermeyen taşıyıcı solüsyon intraperitoneal yolla uygulandı.
PST Grubu (n=8)	SAK modeli oluşturuldu ve 60 dakika sonra 30 mg/kg dozunda PST (% 2'lik etanol içeren distile su içerisinde çözüldürülerek) intraperitoneal yolla enjekte edildi.

3.2. Deney Tasarımı

Çalışma boyunca yapılan tüm uygulamalar aşağıda deney tasarımı şemasında gösterildi (Şekil 14).



Şekil 14. Deney tasarım şeması.

3.3. Taşıyıcı Solüsyonu Hazırlanması ve Uygulanması

Taşıyıcı solüsyon distile su içerisinde % 2'lik etanol olacak şekilde hazırlandı. SHAM grubu ve SAK grubundaki hayvanlara model oluşturulduktan 60 dakika sonra intraperitoneal yolla enjekte edildi.

3.4. Piseatannol Çözeltisi Hazırlanması ve Uygulanması

Piseatannol çözeltisi hazırlamak amacıyla PST (Cayman Chemical; Cat. No: 10083-24-6) belirlenen miktarda hassas terazi de tartıldı. Sıçanların ağırlıklarına göre belirlenen PST dozu her hayvan için ayrı bir ependorf tüpe konuldu. İlk olarak % 99'luk etanol içinde çözdürülüp daha sonra distile su ile seyreltildi. Taşıyıcı çözeltinin nihai etanol konsantrasyonu % 2 olarak belirlendi. Çözelti uygulamadan hemen önce hazırlandı ve taze olarak PST grubundaki sıçanlara SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra intraperitoneal yolla 30 mg/kg dozunda uygulandı.

3.5. Anestezi Uygulanması

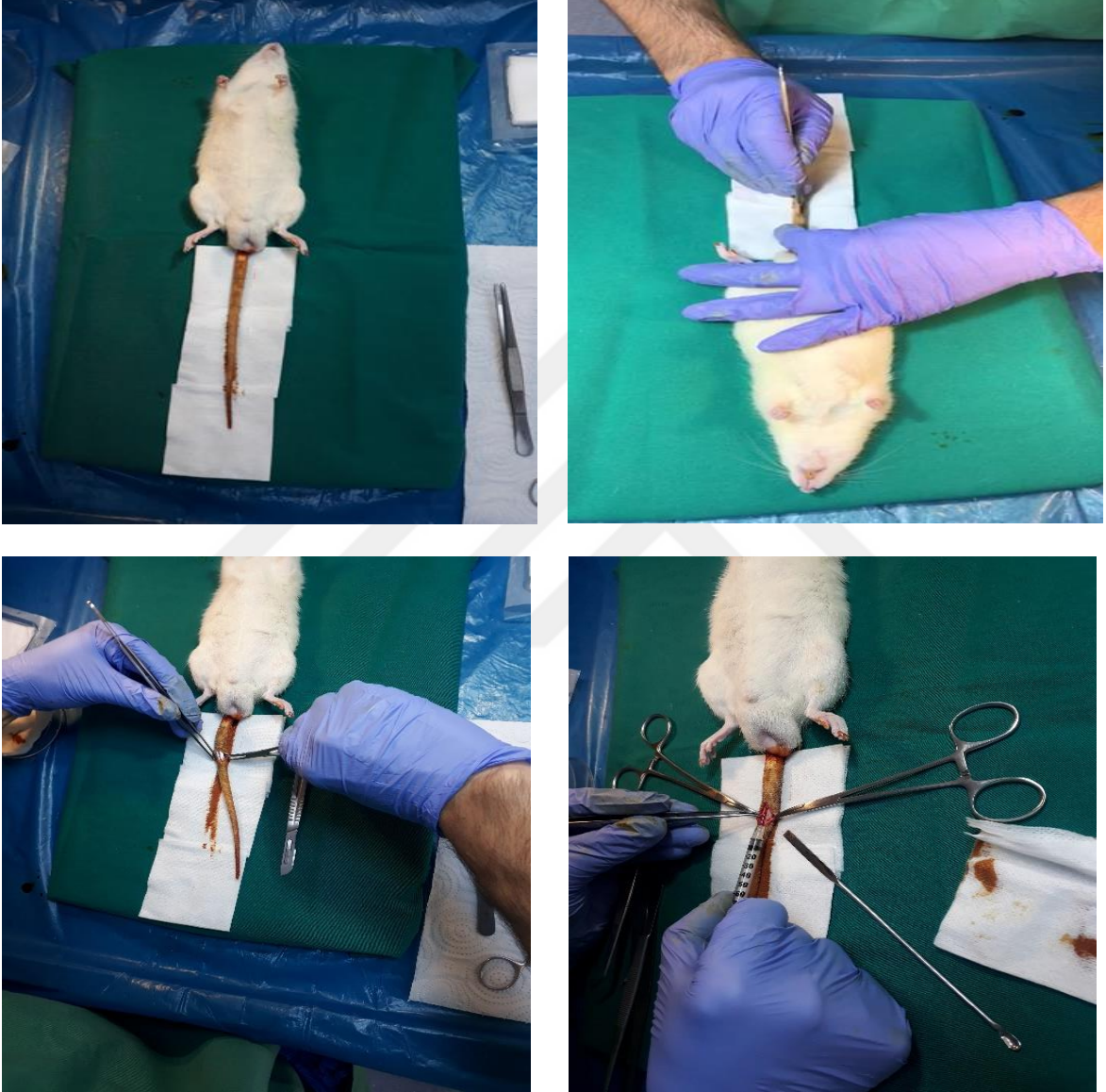
Sıçanlar kas içi ketamin hidroklorür (60- 80 mg/kg; Ketazol-Richter Pharma AG) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg; Xylazin Bio % 2-Bioveta) kullanılarak anestezi edildi (Ovalı ve Uzun, 2017).

3.6. Yöntem

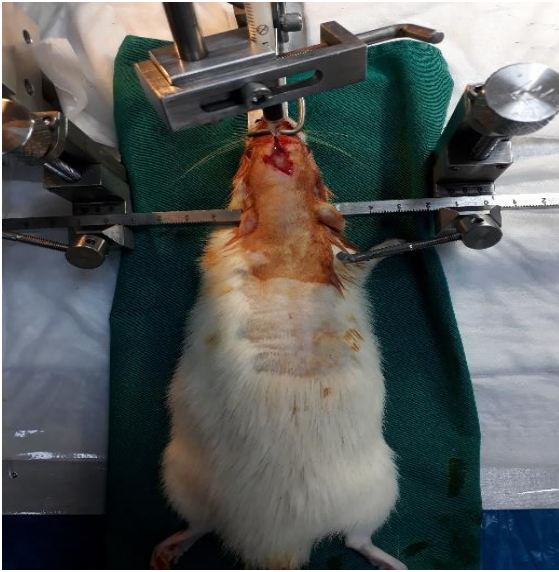
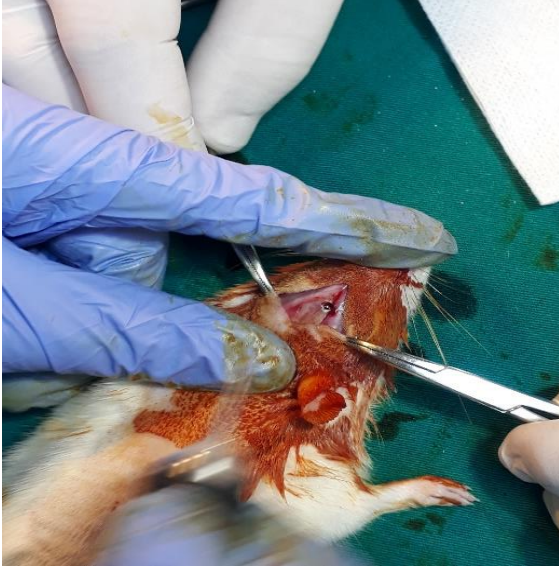
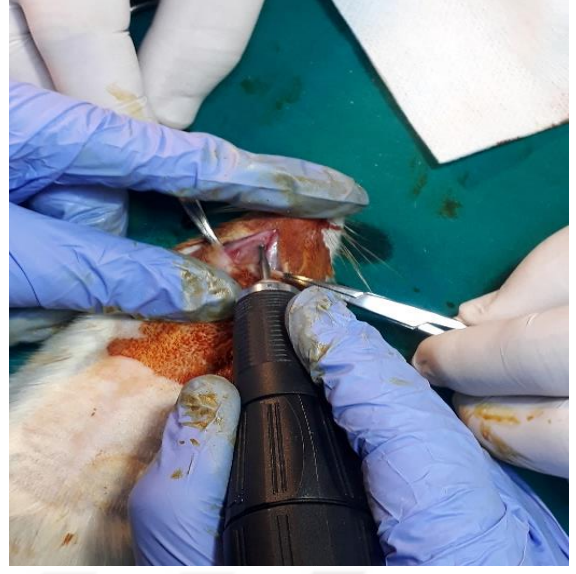
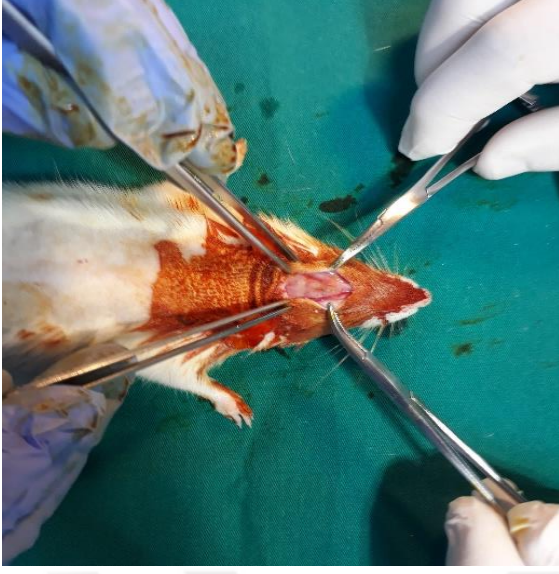
3.6.1. Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması

SAK modeli SAK ve PST grubunda gerçekleştirildi. Genel anesteziye alınan sıçanların kafatasının ön bölgesi traş edildi. Kuyruk vertikal insizyon ile açıldı ve kuyruktan 120 µl arteriyel kan alındı. Frontal bölge vertikal insizyon ile deri ve kaslar açılarak bregma kemik bileşkesine ulaşıldı. Stereotaksi cihazı kullanılarak iğne sagittal düzlemin 2 mm sağına 30 derece yatırıldı ve 1.5 mm çapındaki burr deliği ile orta hatta bregmanın 7 mm önüne yerleştirildi. 120 µl heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan, 30G'lik bir iğne ile prekiazmatik sisternaya 10 saniyede enjekte edildi. İnsizyon bölgesi dikildi ve kapatıldı.

SHAM grubunda ise yine stereotaksi cihazı kullanılarak 30G'lik bir iğne ile preiazmatik sisternada 10 saniye beklenildi. İnsizyon bölgesi dikildi ve kapatıldı (Prunell vd., 2002).



Şekil 15. Kuyruktan kan alınımını gösteren örnek görüntüler.



Şekil 16. Subaraknoid kanama modelinin oluşturulmasını gösteren örnek görüntüler.

3.7. Nörodavranışsal Değerlendirme

Tüm sıçanlar deneysel uygulamalara başlanılmadan 1 gün önce nörolojik testlere tabi tutuldu. Aynı testler SAK sonrası 24. saatte tekrarlandı. Bu amaçla Garcia nörolojik muayenesi, Rotarod testi ve Horizontal bar skorlaması yapıldı.

3.7.1. Garcia Nörolojik Muayene

Nörolojik ve duyuşal fonksiyonların değerlendirilmesi amacı ile Garcia'nın geliştirdiği ölçek kullanıldı. Bu amaçla yapılan skorlama SAK'tan 24 saat önce ve 24 saat sonra hayvanların hangi grupta olduğunu bilmeyen iki gözlemci tarafından gerçekleştirildi (Garcia vd., 1995).

Skorlamada spontan aktivite (0-3 puan), dört uzuv hareketinde simetri (0-3 puan), ön pençe uzatma (0-3 puan), tırmanma (1-3 puan), vücut propriyosepsiyonu (1-3 puan) ve titreşim duyusu (1-3 puan) olmak üzere altı test toplam skor 3 ile 18 arasında olmak üzere değerlendirildi. Skorun düşük olması nörolojik disfonksiyonun daha şiddetli olduğunu göstermektedir.

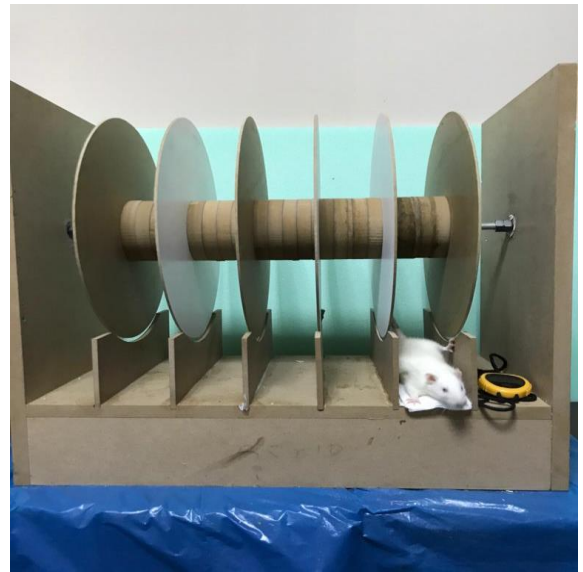
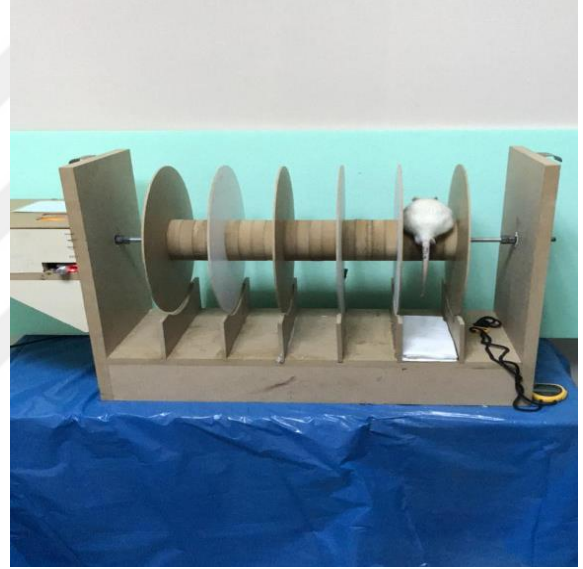
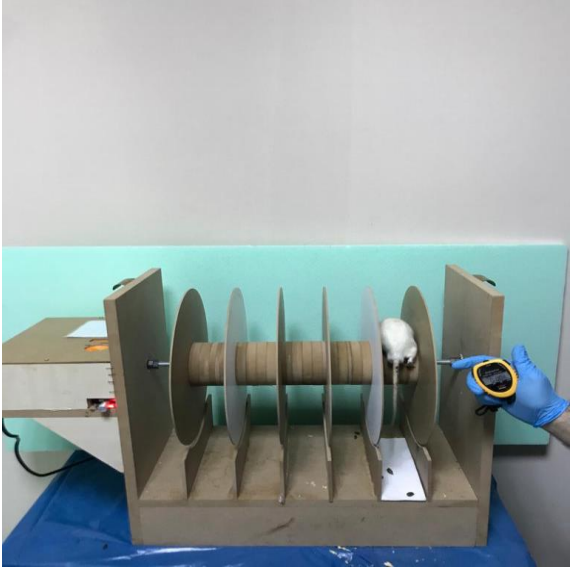
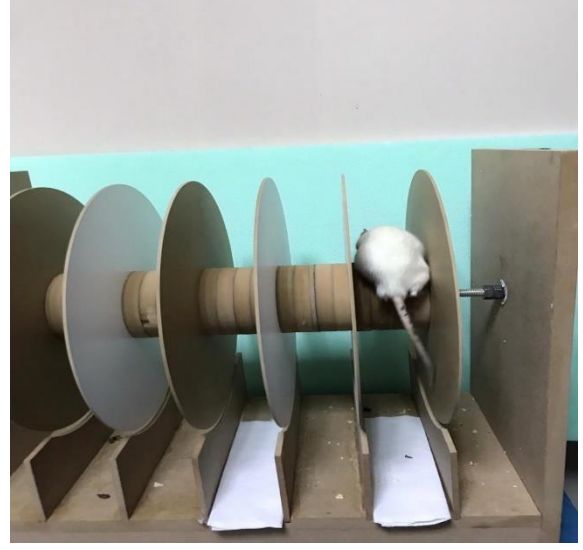
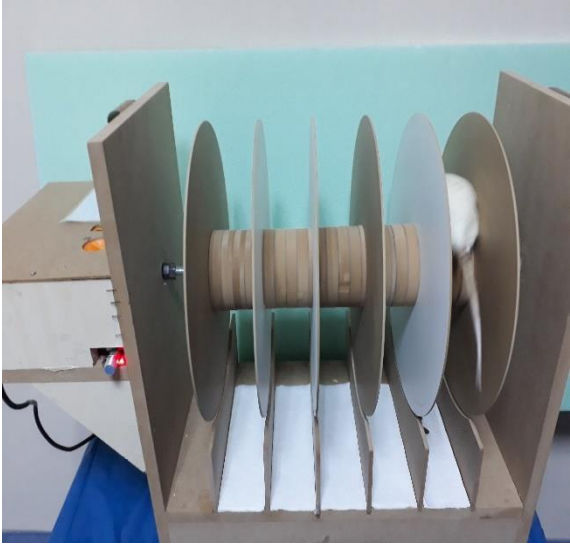
3.7.2. Rotarod Testi

Rotarod testi, kemirgenlerde denge davranışını ve lokomotor yeteneği değerlendirmek amacı ile kullanıldı. Bu test, genellikle kemirgenler için kullanılan, zorlanmış motor aktiviteyi değerlendirmeye imkan veren uzun silindirik dönen bir çubuk üzerindeki performansı ölçen Rotarod cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Sıçanlar ilk olarak iki gün boyunca 10, 15, 20 rpm hızda eğitime tabi tutuldular. Silindir üzerinde başarılı bir şekilde 180 saniye kalan sıçanlar bir sonraki rpmde eğitildiler. Sıçanların dönen silindirden düşme ihtimaline karşı silindirin altına koruyucu tabaka konuldu.

Eğitim tamamlandıktan sonraki günde sıçanlara kanama modeli oluşturulmadan 24 saat önce ve oluşturulduktan 24 saat sonra ayrı ayrı 10, 15, 20 rpmde düşme gecikmesi kaydedildi. Kemirgenler çubuktan aşağıya yerleştirilmiş plakaya düştüğünde, hayvanın düşme gecikmesi (saniye cinsinden) kaydedildi. Hayvanın bu dönen çubuk üzerinde kaldığı süre, onların dengesinin, koordinasyonunun, fiziksel durumunun ve motor planlamasının bir ölçüsü olarak kabul edildi. Test sırasında atlama, pasif rotasyonlar gibi diğer herhangi bir aktivite ortaya çıkması durumunda bu durumlar da ayrıca kaydedildi (Deacon, 2013).





Şekil 17. Rotarod testi uygulamasını gösteren örnek görüntüler.

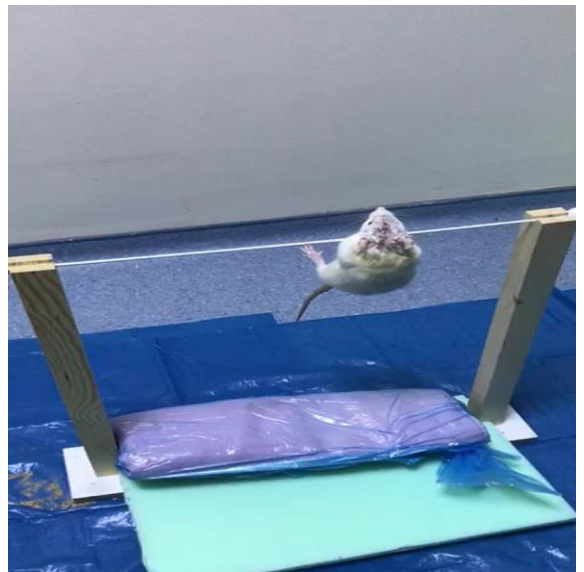
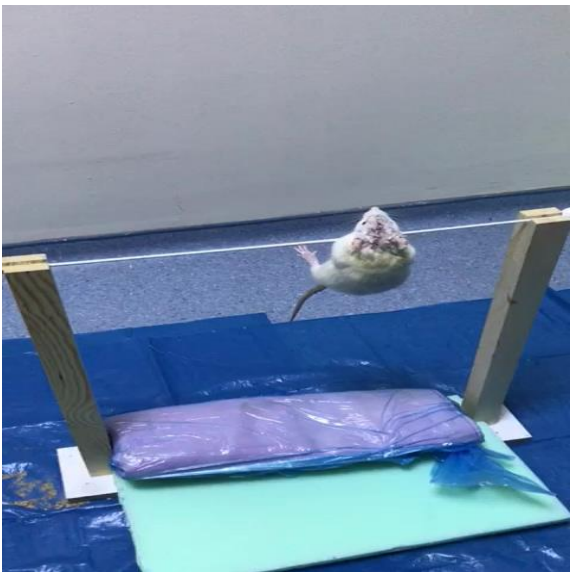
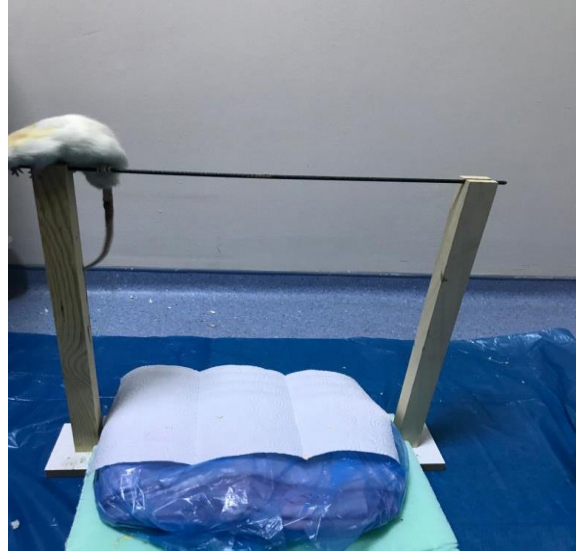
3.7.3. Horizontal Bar Skorlaması

Horizontal bar metodu, sıçanların ön ayakların gücünü ve koordinasyonunu ölçmek amacı ile kullanıldı. Bu amaçla kullanılan düzenek deney hayvanlarının yumuşak inişini sağlamak için 3 mm ve 5 mm çapında ve 38 cm uzunluğunda, iki ucunda laboratuvar kelepçesi ile destekli ve yastıklı bir yüzey ile 49 cm yukarıda yatay olarak asılı metal çubukları kullanılarak hazırlandı. Sıçanlar, metal çubuğu yalnızca ön pençelerinin kavramasını sağlamak için metal çubuğun ortasına yerleştirildi. Sıçanların düşme zamanı bir kronometre ile kaydedildi ve ardından Deacon tarafından tarif edildiği gibi skorlara çevrildi (Deacon,2013; Tablo 2). Horizontal bar testi SAK'tan 24 saat önce ve SAK'tan 24 saat sonra iki gözlemci tarafından değerlendirildi. Sıçanın horizontal barın iki ucundan birine ulaşması 5 puan olarak değerlendirildi.

Tablo 2

Horizontal bar skorlaması

Test	Skor
1-5 saniye arasında düşme	1 puan
6-10 saniye arasında düşme	2 puan
11-20 saniye arasında düşme	3 puan
21-30 saniye arasında düşme	4 puan
30 saniyeden sonra düşme	5 puan



Şekil 18. Horizontal bar skorlama işlemini gösteren örnek görüntüler.

3.8. Ötenazi ve Örneklerin Toplanması

Deney gruplarında yer alan sıçanlara uygulamaların tamamlanmasının ardından anestezi altında servikal dislokasyon işlemi uygulanarak ötenazi gerçekleştirildi ve frontal korteksleri soğuk buz bloğu üstünde hızlı bir şekilde çıkarıldı. Her grupta mevcut 8 hayvanın 3'nün beyin dokusu beyin ödemi belirlenmesi için kullanıldı. Diğer 5 hayvanın beyin dokuları histopatolojik ve genetik incelemeler için kullanıldı. Genetik incelemeler için alınan beyin dokuları analiz edilene kadar -80'de saklandı. Histopatoloji incelemeleri için alınan beyin dokuları ise analizler için % 4'lük formaldehitte konuldu.

3.9. Beyin Ödemi Tayini

Beyin ödeme belirleme işlemi amacı ile alınan total beyinlerin hızlı bir şekilde ıslak ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra doku parçaları +70 °C'de 72 saat süre ile etüvde tutuldu. 72 saat sonrasında doku parçaları etüvden çıkarıldı ve kuru ağırlıkları ölçüldü. Islak ve kuru ağırlık oranı (%) olarak belirlendi (Ding vd., 2015).

$$\text{Beyin Sıvı İçeriği} = [(\text{Islak Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Islak Ağırlık}] \times \%100$$

3.10. Genetik Analizler

3.10.1. Total RNA İzolasyonu

Elde edilen frontal korteks dokusundan ilk olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Alınan örneklerden yaklaşık 25-30 mg beyin dokusu bölümleri ilk olarak 2 ml' lik steril tüplere konuldu. Daha sonra ependorf tüpler 10 saniye sıvı azotta bekletildi. Tüplerin kapakları açılarak içerisine bir adet steril çelik bilye konulduktan sonra homejenizatör cihazına (Retsch MM400) yerleştirildi ve dokular homojenize edildi. PURE Link RNA MiniKit (CatNo. 12183018A) kullanılarak elde edilen homejenatlardan total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini için NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Saflık oranı 260/280 nm'de ölçüm yapılan RNA'lardan 1.8-2.1 arası değerler cDNA eldesi için kullanılabilir kabul edildi. Elde edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı (Ovalı ve Uzun, 2017).

3.10.2. cDNA Eldesi

Dokuların RNA yoğunlukları spektrofotometrik olarak belirlendi ve PCR tüplerine konuldu. cDNA eldesi kitte belirtilen yöntemine göre uygulandı (High Capacity cDNA Revere Transcription Kit, ABD). cDNA eldesi için uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3

cDNA sentez protokolü

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
10x RT Buffer	2 µl
dNTP	0,8 µl
Random Primer	2 µl
Enzim	1 µl
Su	4,2 µl
RNA	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3'te bileşimi belirtilen karışım PCR tüplerine konuldu ve belirlenen şartlarda PCR cihazında çalışıldı (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler 96-Well PCR). cDNA elde etmek için uygulanan protokol Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4

PCR koşulları

Sıcaklık	Zaman
25 °C	10 dakika
37 °C	120 dakika
85 °C	5 dakika

3.10.3. Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

cDNA örnekleri çoğaltıldı ve sonrasında quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR, StepOnePlus™ Real-Time PCR System) çalışması için kullanıldı. Gen ekspresyon seviyeleri TaqMan (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, Ampliqon, Litvanya) kullanılarak analiz edildi.

qRT-PCR yönteminde gen ekspresyon seviyelerine bakılan GRP78, PERK, ATF4, CHOP, p53 ve NF-κB genleri için normalizasyon yapıldı. Normalizasyon için β-actin kullanıldı. Bu çalışmada, kısmi miktarlara dayalı PCR yönteminde bulunan sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR yöntemi kullanıldı ve qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Real-Time PCR'da uygulanan protokol Tablo 5'te belirtilmiştir.

Tablo 5

Real Time PCR bileşen miktarları

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
SyberGreen Master Mix	5 µl
Forward Primer	0,75 µl
Reverse Primer	0,75 µl
RNase Free Su	2,5 µl
cDNA	1 µl
Toplam	10 µl

3.11. Histopatolojik Analizler

Işık mikroskopik inceleme için frontal korteks doku örnekleri ilk önce % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri kasetlere konularak akan bir su altında 2 saat boyunca yıkandı. Dokulardan suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde sırasıyla alkol serilerinden (% 60, % 70, % 80, % 90, % 96 ve % 100) geçirildi. Daha sonrasında dokular parlatılmak için ksilolden geçirildi ve parafine gömüldü.

3.11.1. Hemotoksilen-Eozin (HE) Boyama

Hematoksilen asidik yapıları boyayan bazik bir boyadır. Kesitleri mor/mavi renge boyar ve bu boya ile hedeflenen yapılar bazofilik olarak adlandırılır. Bazofilik yapılar arasında hücre çekirdeğindeki DNA, ribozomlardaki RNA ve granüllü endoplazmik retikulum yer alır.

Eozin ise, hematoksilinden sonra yapılan karşı bir boyadır. Bazik yapıları hedef alan asidik bir boyadır. Hedeflediği yapıları pembe/kırmızı renge boyar. Eozini çeken yapılar eozinofilik olarak adlandırılır. Sitoplazma eozinofilik yapıya bir örnektir (Alturkistani vd., 2015).

Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler lamlar üzerine yayıldı. Lamları parafinden arındırmak amacıyla 60 °C etüvde 60 dakika bekletildi ve daha sonra 3x5 dakika ksilole alındı. Lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 90 ve % 70) 1 dakika akan bir suda yıkandı ve Harris Hematoksilen’de 2 dakika boyunca boyandı ve 2x2 dakika akan bir suda yıkandı. Daha sonra lamlar % 1’lik Amonyak-Su karışımına batırıldı ve sonra tekrar 1 dakika akan suda yıkandı. Lamlar 2 dakika Eozinde bekletildi ve artan dereceli alkol serilerinden (% 70, % 80, % 96 ve % 100) geçirildi, 2x1 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı. Boyanan kesitlerde, hücresel piknoz ve ödem parametreleri LED floresan ataçmanlı Olympus CX43 model mikroskop altında (x100) HE boyama kriterlerine göre skorlandı (Tablo 6).

Tablo 6

HE boyama skoru

Derece	Skor
Derece 0	Yok
Derece 1	Hafif
Derece 2	Orta
Derece 3	Şiddetli
Derece 4	Ciddi Şiddette

3.11.2. TUNEL Boyama

Lamlara parafin bloklarından 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon amacıyla 60 °C etüvde 1 saat bekletildi, sonra 3x5 dakika ksilole alındı. Ksilol uygulaması sonrasında lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 80 ve % 70) rehidrate edildi. Alkolden arındırılmak amacıyla kesitler 2x1 dakika distile sudan geçirildi. Proteinaz K enzim (37 °C etüvde) 15 dk uygulandı. Daha sonra 5 dakika süreyle % 3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Bu işlemden sonra kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve 3 dakika boyunca Equilibration Buffer ile işleme tabii tutuldu. TdT (Terminal deoksinükleotidil transferaz) enzim çalışma solüsyonunda 37 °C etüvde 60 dakika bekletildi. Working Stop/Washbuffer solüsyonunda 10 dakika boyunca yıkandı. Digoxigenin peroxidaz ile 30 dakika boyunca muamele edildi ve PBS ile yıkandı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek amacıyla DAB (diaminobenzidin) kromojen ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dakika süresince Vectör Methylene Green (H-3402-500) uygulandı. Daha sonra distile su ile 2x1 dakika yıkandı. Lamalar sırayla artan dereceli alkol serilerinden (% 70, % 80, % 96 ve % 100) geçirildi, 2x1 dakika ksilole alındı en sonunda entellan ile kapatıldı.

3.11.3. Kristal Viöle Boyama

Kristal viöle boyama olarak da adlandırılan nissl boyama beyin ve spinal korddaki nöronal yapıyı incelemek için kullanılır (Kádár vd., 2009).

Bu amaçla elde edilen kesitler 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden (% 100, % 96, % 90 ve % 70) geçirildi ve 1 dakika boyunca akan suda yıkandı. Sonrasında, Kristal Viöle (Abcam ab246816) ile 2 dakika süresiyle boyandı, 1 dakika akan suda yıkandı. Bu işlemi takiben % 100 N-Butanol alkolde 2x1 dakika bekletildi sonrasında ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.12. İstatistiksel Analizler

Çalışmada gen ekspresyon düzeylerindeki değişimleri belirlemek için ilk önce qRT-PCR analizinden CP (crossing points) değerleri elde ettik. Genetik analizlerin istatistiği için β -aktine göre normalize ettiğimiz bu veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Verilerin istatistiksel anlam düzeyleri IBM SPSS Statistics 26 yazılımını kullanarak gerçekleştirildi. Çoklu grup karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma ise Mann-Whitney U-testi ile yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

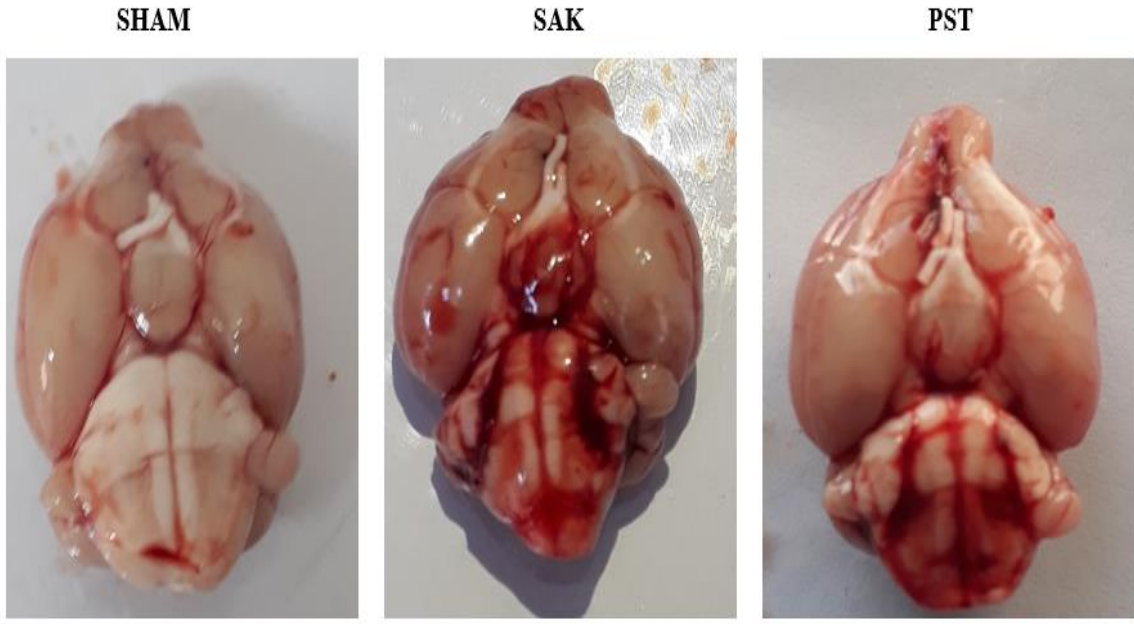
Bu çalışmada, Wistar Albino ırkı sıçanlardan SHAM, SAK ve PST olmak üzere üç grup oluşturuldu. Tüm sıçanların SAK öncesi ve sonrası nörolojik skorları; Garcia nörolojik muayenesi, rotarod testi ve horizontal bar skorlaması yapılarak değerlendirildi. Tüm sıçanlar deneyden 24 saat sonra ötenazi edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. Bu sıçanlardan 3 tanesinden total beyin dokusu elde edilirken, 5 tanesinden ise frontal korteks doku örnekleri alındı. Beyin dokusu örneklerinde aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. Total beyin dokuları kurutulup ıslak/kuru ağırlık oranına göre beyin ödemi düzeyi hesaplandı.
2. Frontal korteks bölgesinde GRP78, PERK, ATF4, CHOP, p53 ve NF-κB gen ekspresyonları düzeyleri belirlendi.
3. Frontal korteks bölgesinde histopatolojik analizler yapıldı. Bu amaçla TUNEL, Kristal viyole ve Hematoksilen-Eozin boyama yapıldı.

4.1. Subaraknoid Kanama Model ve Mortalite Bulguları

Bu çalışma her grupta 8 hayvan olacak şekilde 24 adet sıçan üzerinden gerçekleştirildi. Deney boyunca gruplarda ölüm gözlenmedi.

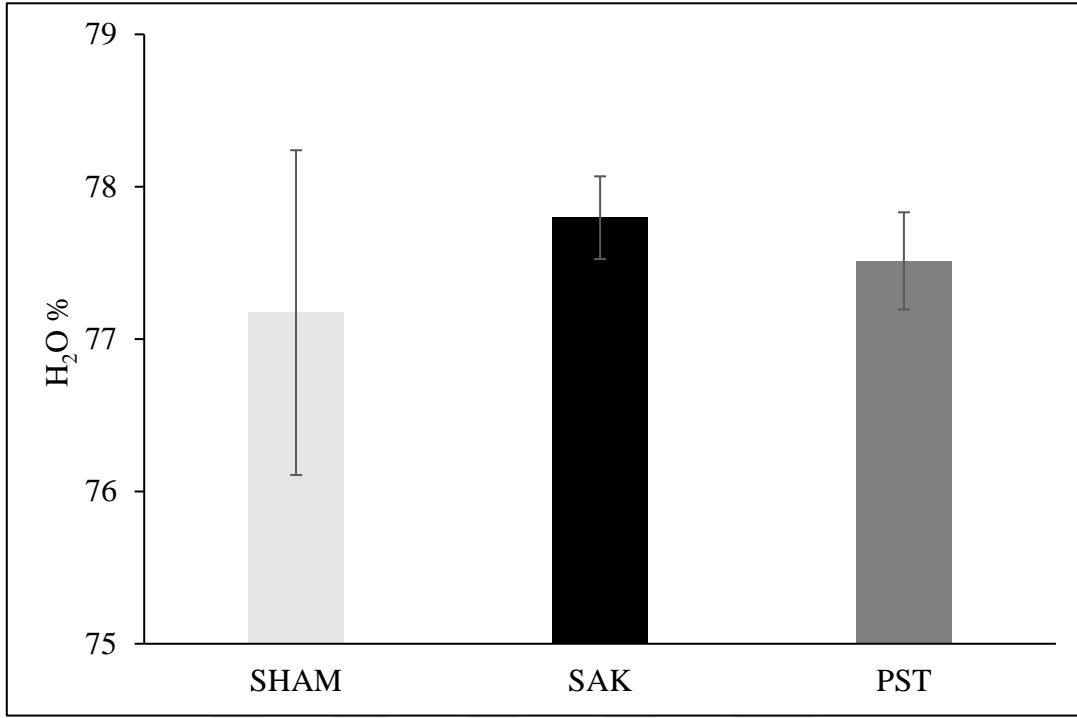
SAK modellemesinin sonucunda SAK grubunda subaraknoid bölgede şiddetli kanama bulgularına rastlandı. PST grubunda ise subaraknoid bölgede kanamanın azaldığı gözlemlendi. Kanama düzeylerine yönelik herhangi bir hesaplama yapılmadı. Sadece gözlemsel olarak kanamanın varlığı, azlığı veya çokluğu değerlendirildi. Her bir gruba ait Subaraknoid bölgedeki kanama alanlarını gösteren birer adet örnek fotoğraf Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Gruplara ait subaraknoid bölgede kanama alanlarından örnek görüntüler.

4.2. Beyin Ödemi Analiz Bulguları

Beyin ödemi sonuçlarına göre SAK ve PST grubunda SHAM grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı olmayan artışlar olduğu belirlendi ($p > 0,05$). SHAM grubunda $\% 77,17 \pm 1,07$ olarak belirlenen beyin su düzeyi SAK grubunda $\% 77,8 \pm 0,27$ ve PST grubunda ise $\% 77,51 \pm 0,32$ belirlendi. Elde edilen veriler Şekil 20’de gösterilmiştir.



Şekil 20. Grupların beyin ıslak/kuru ağırlık oranı verilerinin yüzde olarak karşılaştırılması.

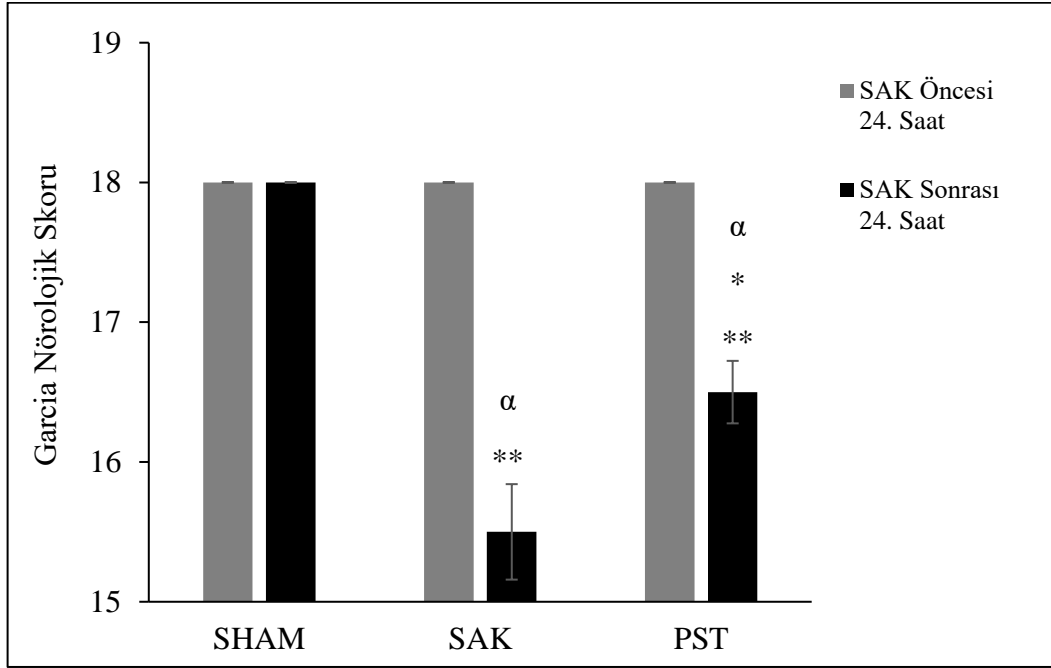
4.3. Nörodavranışsal Değerlendirme Bulguları

Sıçanların nörolojik değerlendirmeleri Garcia nörolojik muayenesi, rotarod testi ve horizontal bar skorlaması ile SAK öncesi ve sonrası 24. saatte gerçekleştirildi.

4.3.1. Garcia Skorlaması Bulguları

Garcia nörolojik muayenesi ile sıçanların nörolojik fonksiyonları değerlendirildi. SAK öncesi 24. saatte yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). SAK sonrası 24. saatte yapılan değerlendirmelerde ise SHAM grubuna kıyasla hem SAK hem de PST grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar belirlendi ($p < 0,01$). SAK ve PST grupları kıyaslandığında ise PST grubunda total Garcia skorunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalara ek olarak her grubun SAK öncesi ve sonrası verileri kendi aralarında karşılaştırıldı. SHAM grubunun iki verisi arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). SAK ve PST grubunda ise SAK sonrası verilerin SAK öncesi verilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0,01$; Şekil 21).

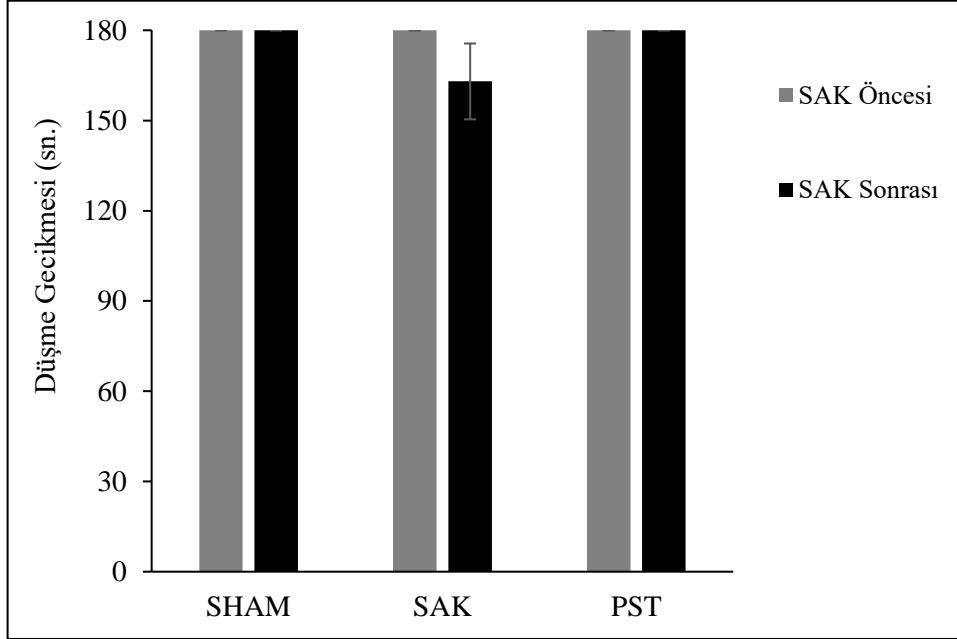


Şekil 21. Garcia nörolojik skorlaması verilerinin karşılaştırılması. *: SAK grubunun SAK sonrası 24. saati ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$). **: SHAM grubu SAK sonrası 24. saat verileri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$). α : Grup içinde SAK sonrası 24. saat verileri SAK öncesi verileriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$).

4.3.2. Rotarod Testi Bulguları

Rotarod testi ile sıçanlarda denge ve lokomotor yetenek değerlendirildi. SAK öncesi 24. saatte yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). SAK sonrası 24. saatte yapılan değerlendirmede ise SHAM grubuna göre SAK grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmalar gözlemlendi ($p>0,05$). Ayrıca SAK ve PST grubu kıyaslandığında ise PST'nin rotarod testi sonuçlarını istatistiksel düzeyde anlamlı olmayan bir şekilde arttırdığı gözlemlendi ($p>0,05$).

Rotarod testinde SAK öncesi ve sonrası gruplara ait veriler kendi içinde karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada SHAM ve PST grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$). SAK grubunda ise düşme saniyesindeki gecikmede azalış olmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$; Şekil 22).



Şekil 22. Grupların SAK öncesi ve sonrası rotarod testi (20 rpm) verilerinin karşılaştırılması ($p>0,05$).

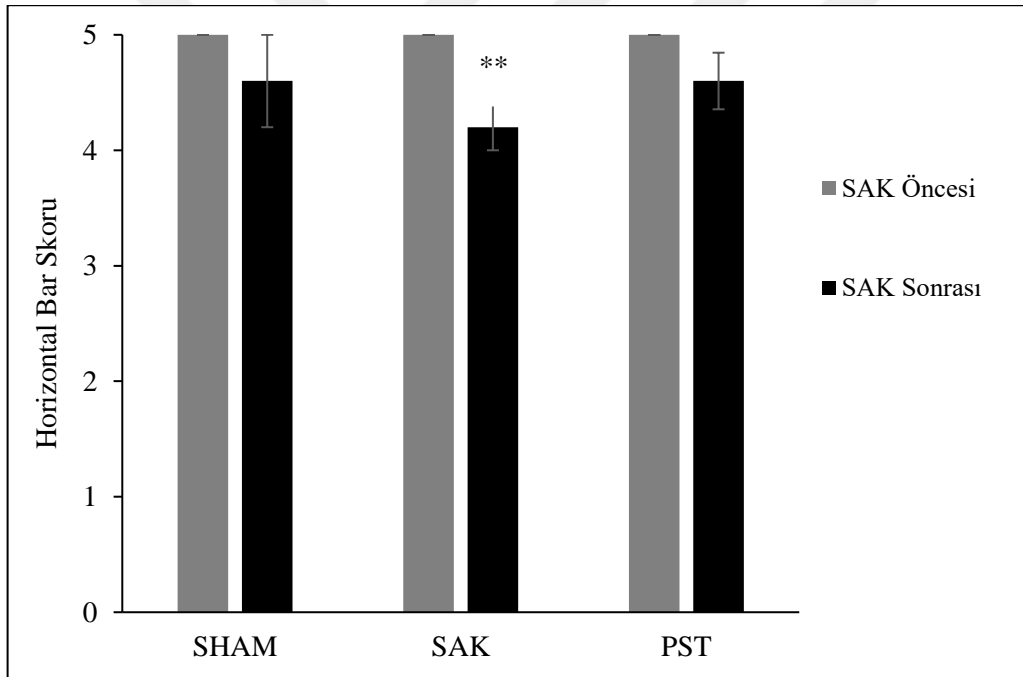
4.3.3. Horizontal Bar Skoruması Bulguları

Horizontal bar testi ile sıçanların ön ayak gücü ve koordinasyonu değerlendirildi. Yapılan teste 3 mm ve 5 mm barlar kullanılarak sıçanların barlardan düşme saniyesi üzerinden puanlama gerçekleştirildi. 3 mm bar skoruması verilerine göre SAK öncesi 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık belirlenmedi (her üç değer için $p>0,05$).

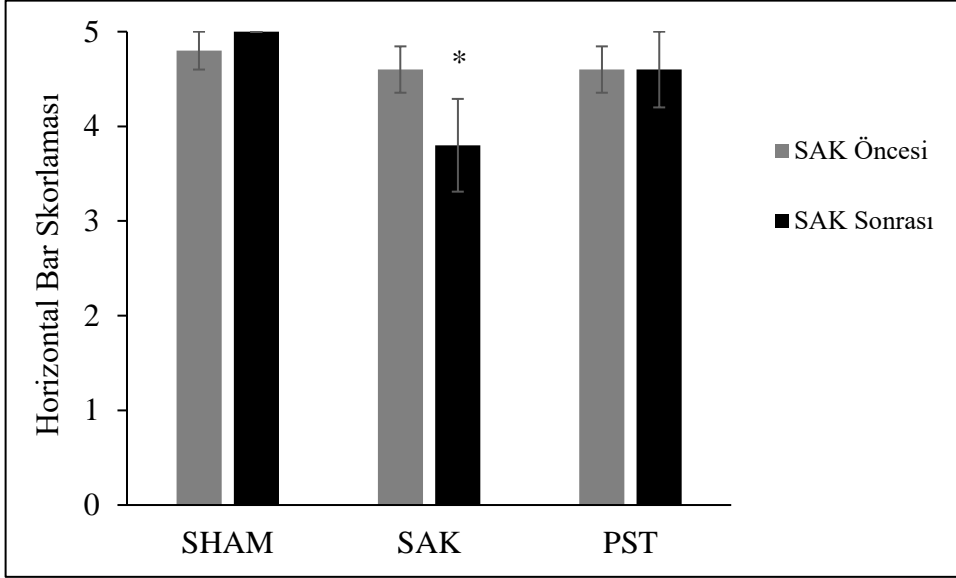
SAK öncesi ve sonrası 24. saatte horizontal bar skoruması verileri grupların kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise yalnızca SAK grubu sonuçlarında anlamlı bir düzeyde azalma olduğu anlaşıldı ($p=0,01$). SHAM ve PST gruplarının ilk ve son değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış gözlemlendi ($p>0,05$; Şekil 23).

SAK öncesi 24. saatte gruplar arasında yapılan 5 mm bar skorlama sonuçları ise 3 mm bar sonuçları ile benzer bulundu (her üç değer için $p>0,05$). SAK sonrası 24. saat sonuçlarına bakıldığında ise yalnızca SHAM ile SAK grubunda SAK grubu yönünde istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalma belirlendi ($p=0,05$). SAK ve PST grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamasa da PST uygulamasının skoru artırdığı gözlemlendi ($p>0,05$).

Gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında ise SHAM, SAK ve PST gruplarında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmese de özellikle SAK grubunda SAK sonrası 24. saat sonuçların SAK öncesi 24. saat sonuçlara kıyasla azaldığı gözlemlendi ($p>0,05$; Şekil 24).



Şekil 23. Horizontal bar skorlama verilerinin karşılaştırılması (3 mm). **: Grup içinde SAK sonrası 24. saat verileri SAK öncesi verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,01$).

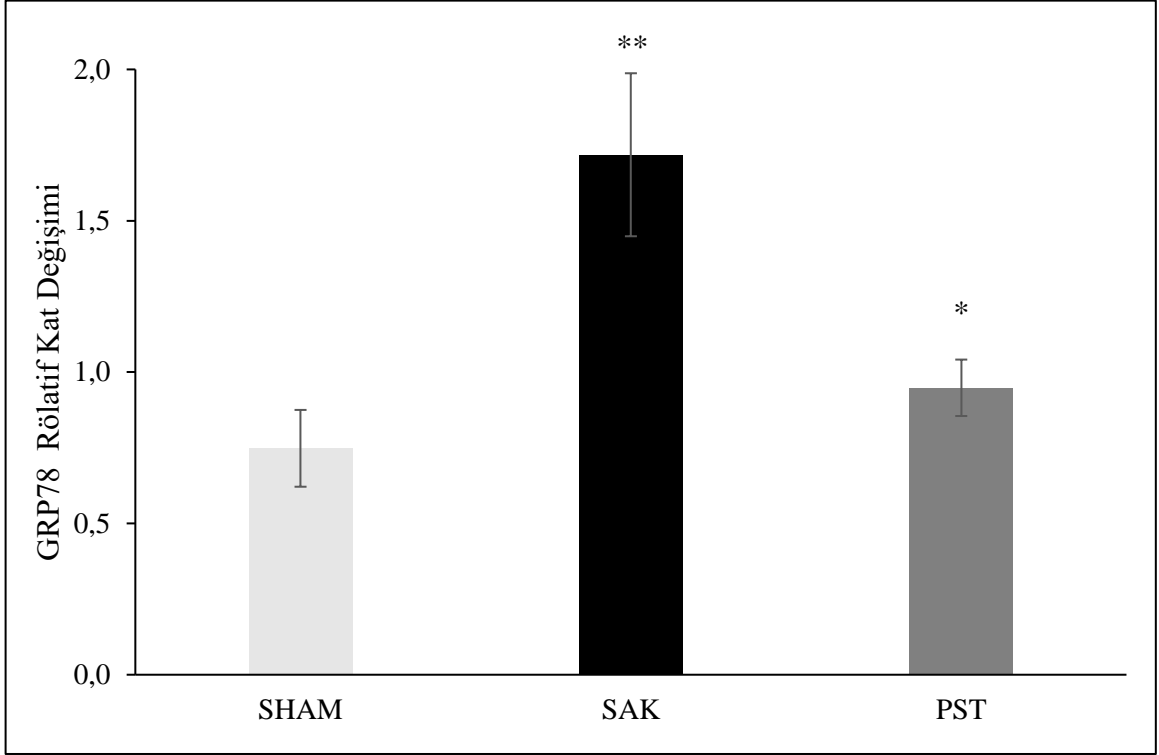


Şekil 24. Horizontal bar skoruması verilerinin karşılaştırılması (5 mm). * : SHAM grubu 24. saat verileri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,05$).

4.4. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişim Bulguları

4.4.1. GRP78 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

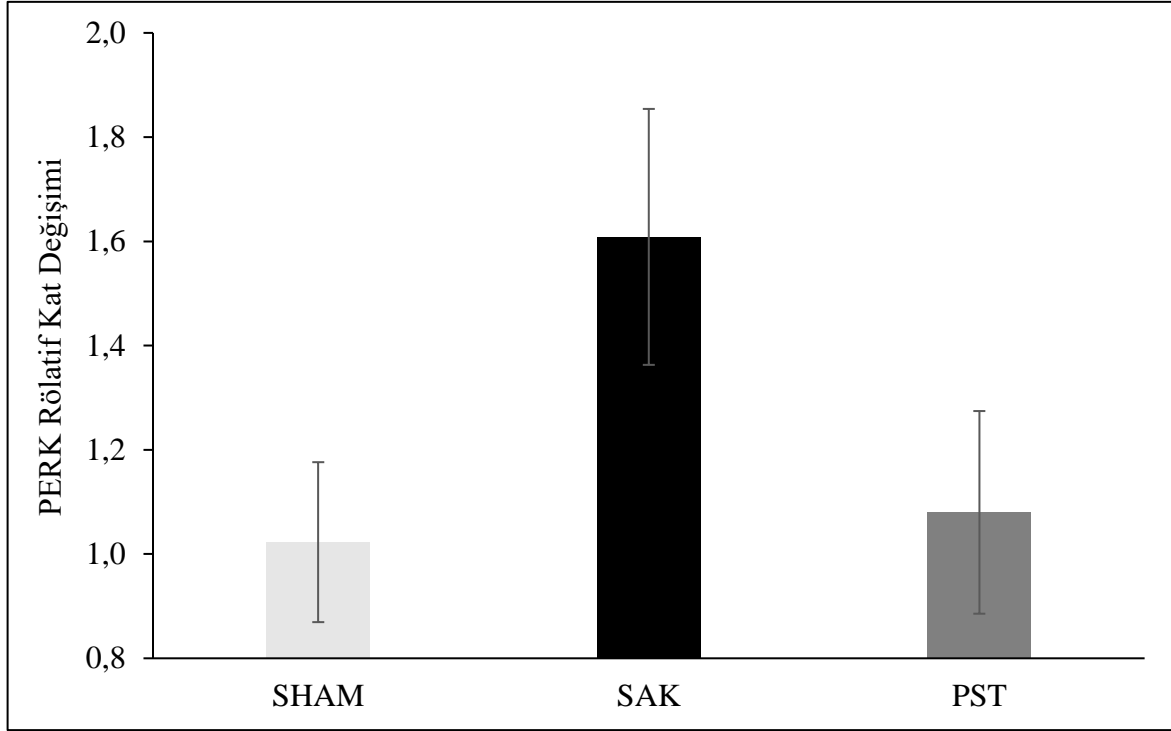
GRP78 gen ekspresyon düzeyleri açısından en yüksek değer SAK grubunda belirlendi ve bu artış SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,01$). PST uygulanan grupta ise GRP78 gen ekspresyon değeri SHAM grubuna yakın bir düzeyde belirlendi ve SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($p<0,05$). GRP78 gen ekspresyon düzeyindeki değişim verileri Şekil 25'te gösterilmiştir.



Şekil 25. GRP78 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması. *: SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$). **: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,01$). y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir.

4.4.2. PERK Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

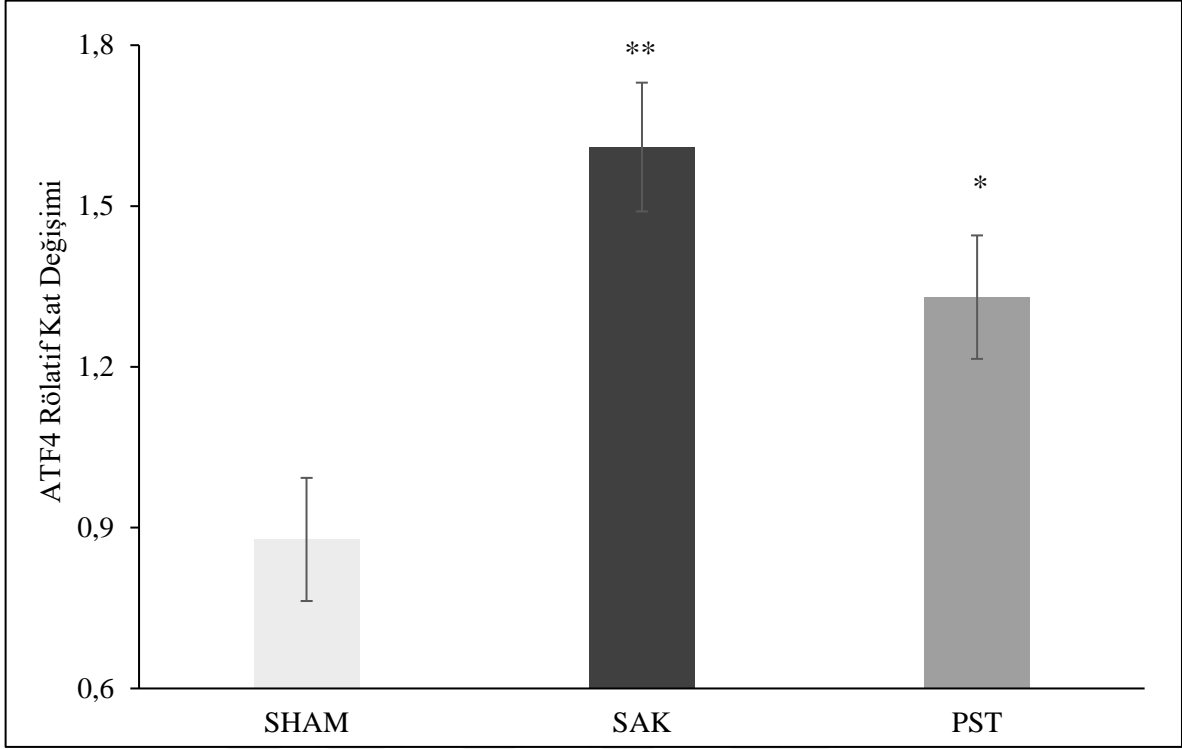
Genetik analizlerle incelenen parametrelerden bir diğeri de PERK'ti. SAK grubundaki PERK gen ekspresyon değeri SHAM ve PST gruplarına göre yaklaşık iki kat bir artış göstermesine rağmen gruplar arasında herhangi istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Şekil 26).



Şekil 26. PERK gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması ($p>0,05$). y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir.

4.4.3. ATF4 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

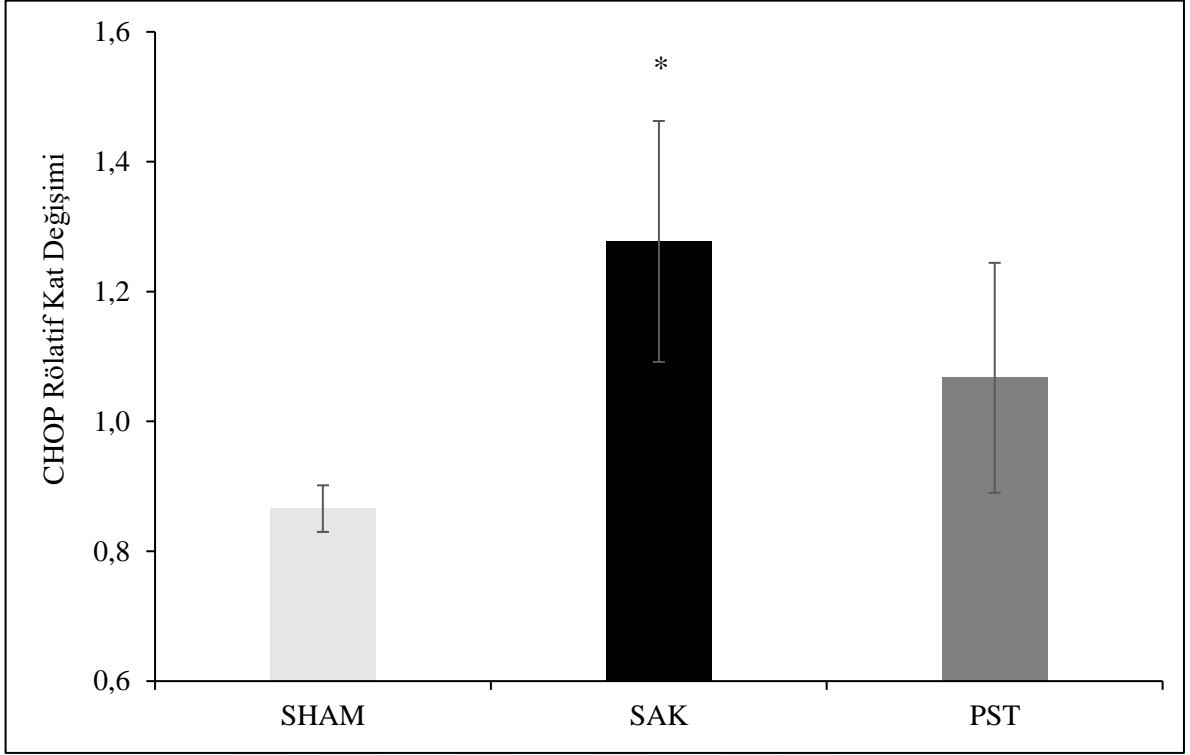
ATF4 geninin normalize edilmiş mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 27'de gösterilmiştir. ATF4 gen ekspresyonu verileri açısından SHAM ve SAK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ($p=0,01$). Ayrıca PST grubu ATF4 gen ekspresyon düzeyleri SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). PST uygulaması SAK sonrası ATF4 gen ekspresyon seviyelerinde bir azalmaya yol açsa da bu azalma SAK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$; Şekil 27).



Şekil 27. ATF4 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması. *: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı $p < 0,05$. **: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı $p = 0,01$. y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir).

4.4.4. CHOP Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

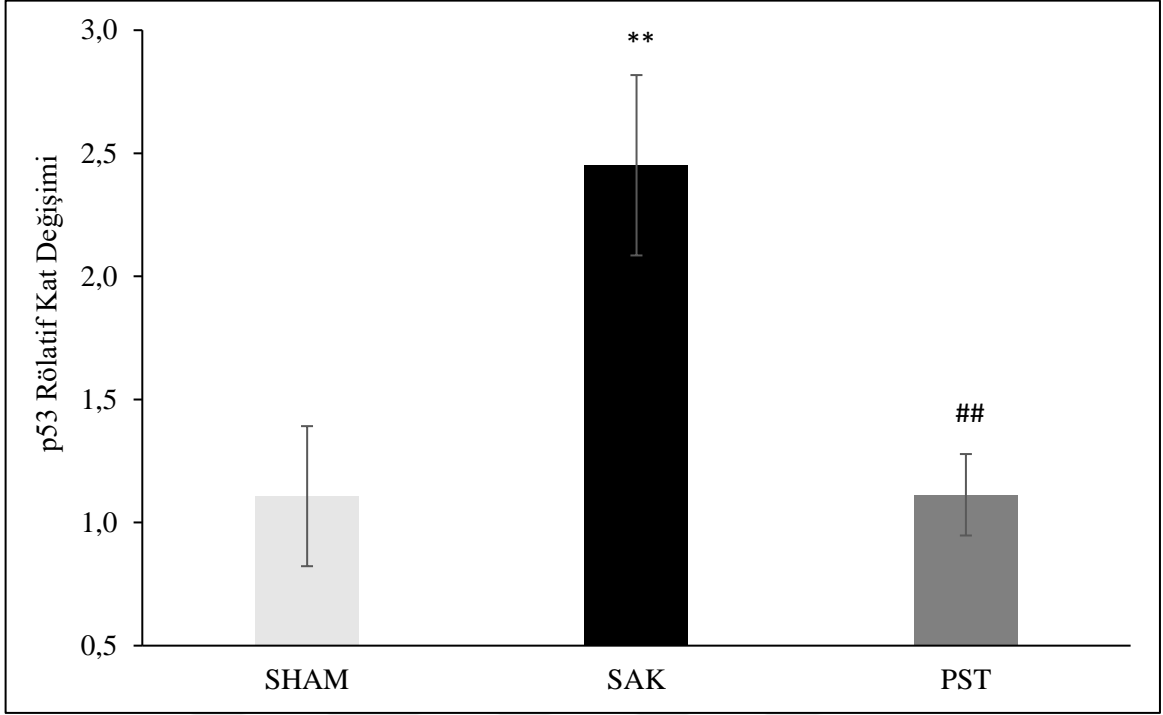
ERS'ye bağlı apoptoz belirteci olarak CHOP gen ekspresyon değerleri de incelendi. CHOP gen ekspresyon değerleri açısından SAK grubunda SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi ($p < 0,05$). SHAM ve PST grubundaki verilerin birbirlerine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. SAK grubuna kıyasla PST grubunda bir azalma meydana gelse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$; Şekil 28).



Şekil 28. CHOP gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması. *: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$). y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir).

4.4.5. p53 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

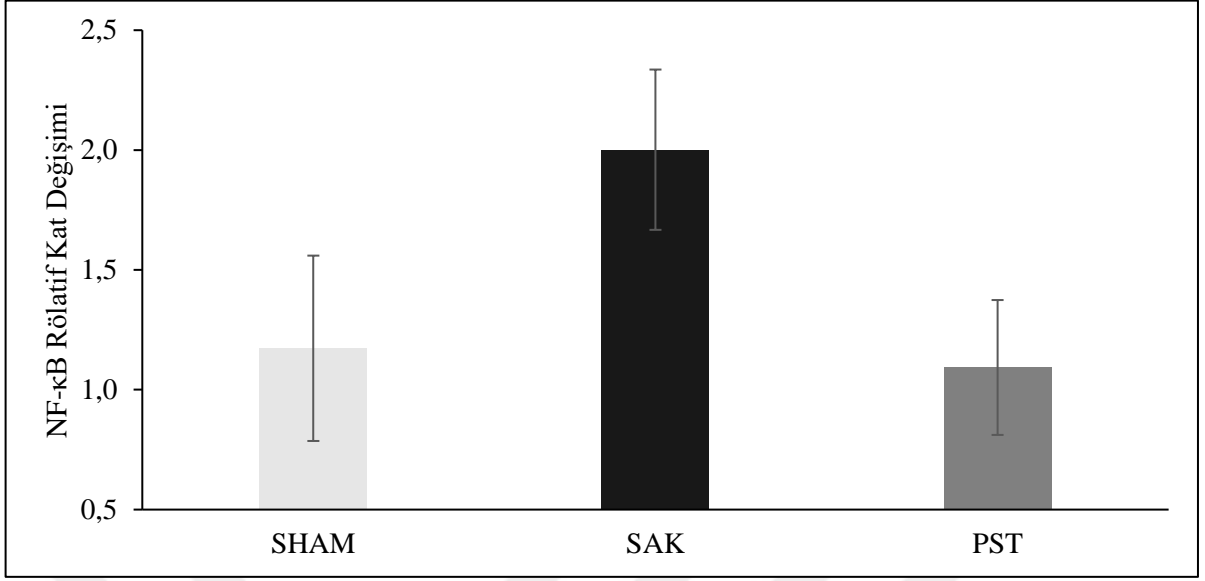
p53 mRNA seviyesindeki rölatif değişimleri açısından SHAM ve SAK grupları arasında yapılan karşılaştırmada SAK grubunda hem SHAM hem de PST grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (her iki karşılaştırma için $p < 0,01$). Bunun yanında PST uygulanan grup p53 değeri açısından SHAM grubu ile kıyaslandığında anlamlı farklılık göstermemiş olup ($p > 0,05$) bu durum PST'nin SAK'ta p53 üzerine etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 29).



Şekil 29. p53 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması. **: SHAM grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$). #: SAK grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$). y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir.

4.4.6. NF- κ B Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

ERS'nin oluşturduğu apoptozda yer alarak PERK yolağı tarafından aktive edilen NF- κ B gen ekspresyon seviyeleri açısından SAK grubu SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış belirlendi ($p > 0,05$). PST grubundaki değerler ile SHAM grubuna ait değerlerin birbirine çok yakın olduğu gözlemlendi ($p > 0,05$). PST uygulamasının SAK grubuna kıyasla PST grubu değerinde yaklaşık % 50 oranında azalmaya sebep olduğu anlaşıldı ($p > 0,05$; Şekil 30).



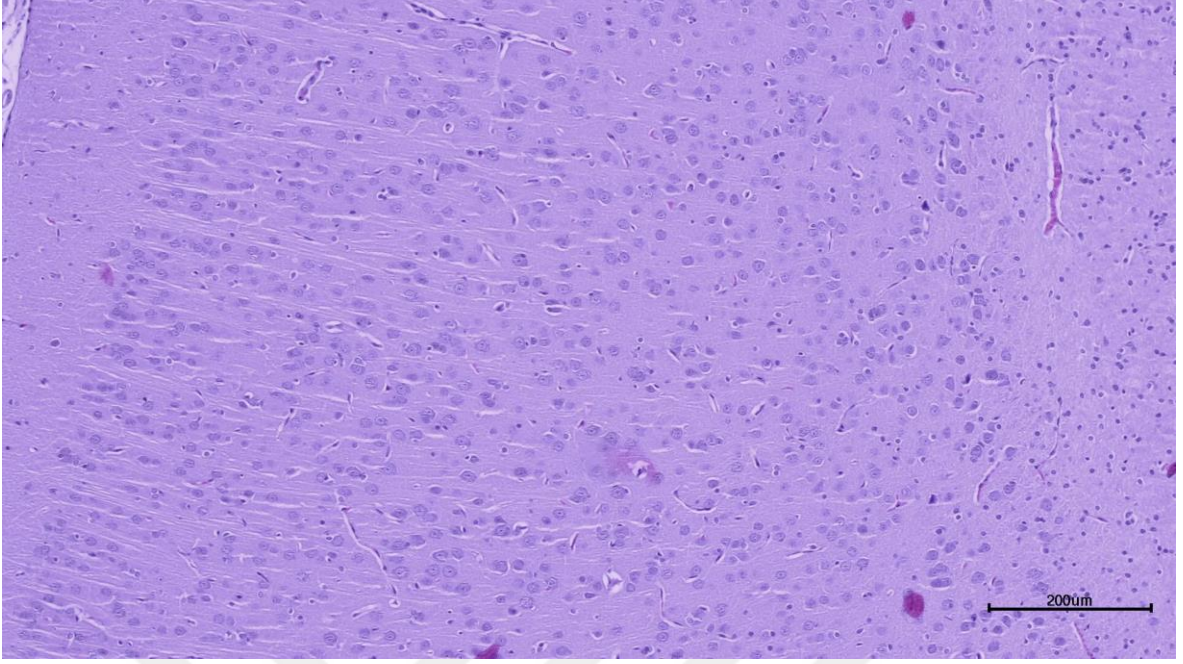
Şekil 30. NF-κB gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması ($p>0,05$). y ekseninde bulunan değerler β -aktine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleridir).

4.5. Histopatolojik Bulgular

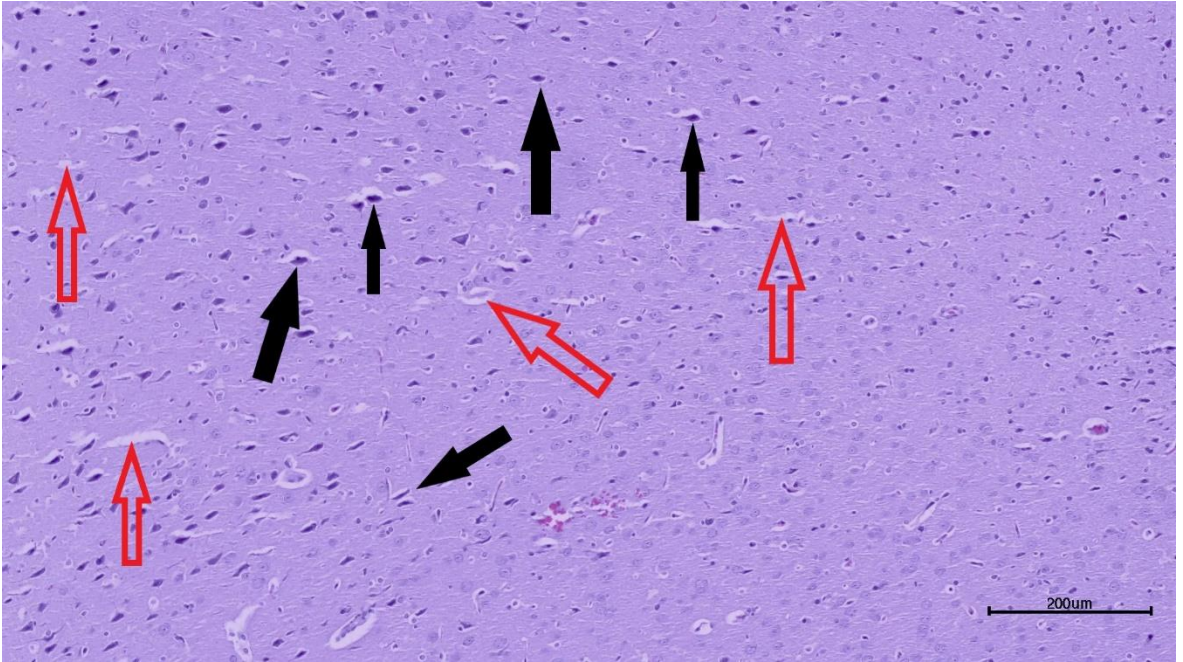
4.5.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Bulguları

Frontal korteks doku örnekleri HE boyama ile hücresel piknoz ve ödem açısından değerlendirildi. SHAM grubunda hücresel piknoz ve ödem bulgusuna rastlanmadı. Hücresel piknoz ve ödem parametrelerinin hem SAK (her iki parametre için $p<0,001$) hem PST (piknoz: $p<0,01$; ödem: $p<0,001$) grubunda SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi (her iki parametre için $p<0,001$). Ayrıca hücresel piknoz ve ödem açısından PST ve SAK grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere PST grubunda bir azalma gözlemlendi (her iki parametre için $p<0,001$; Şekil 34 ve Şekil 35).

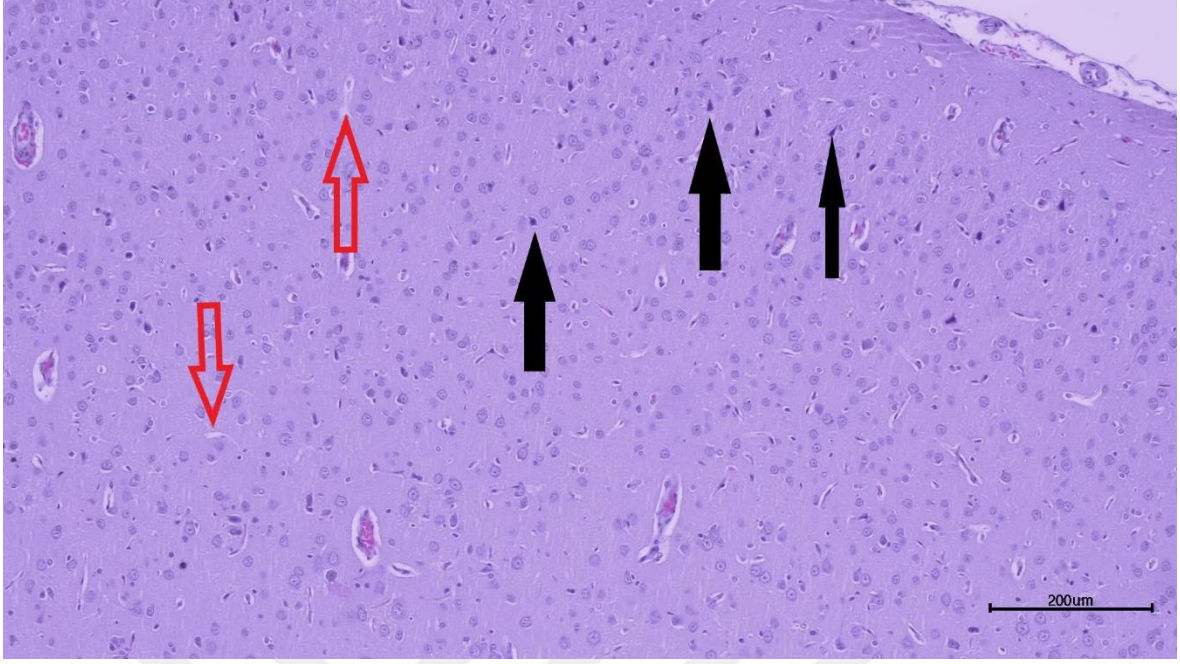
Gruplara ait örnek frontal korteks doku kesitleri Şekil 31, Şekil 32 ve Şekil 33'te gösterilmiştir.



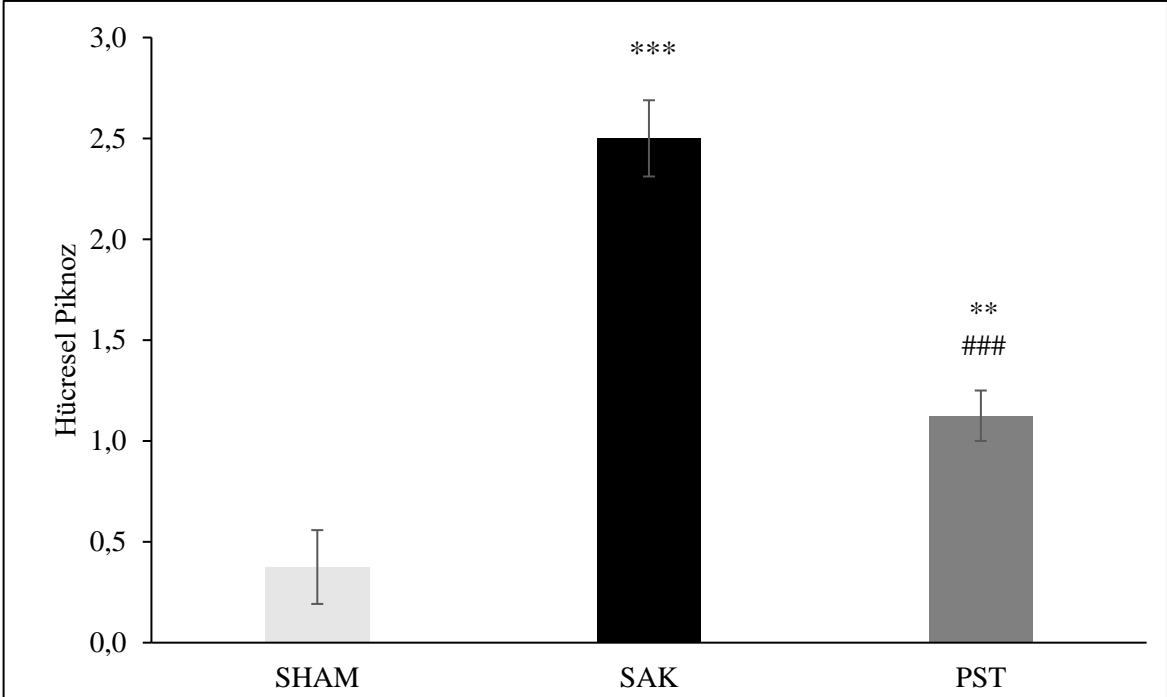
Şekil 31. SHAM grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE,100x).



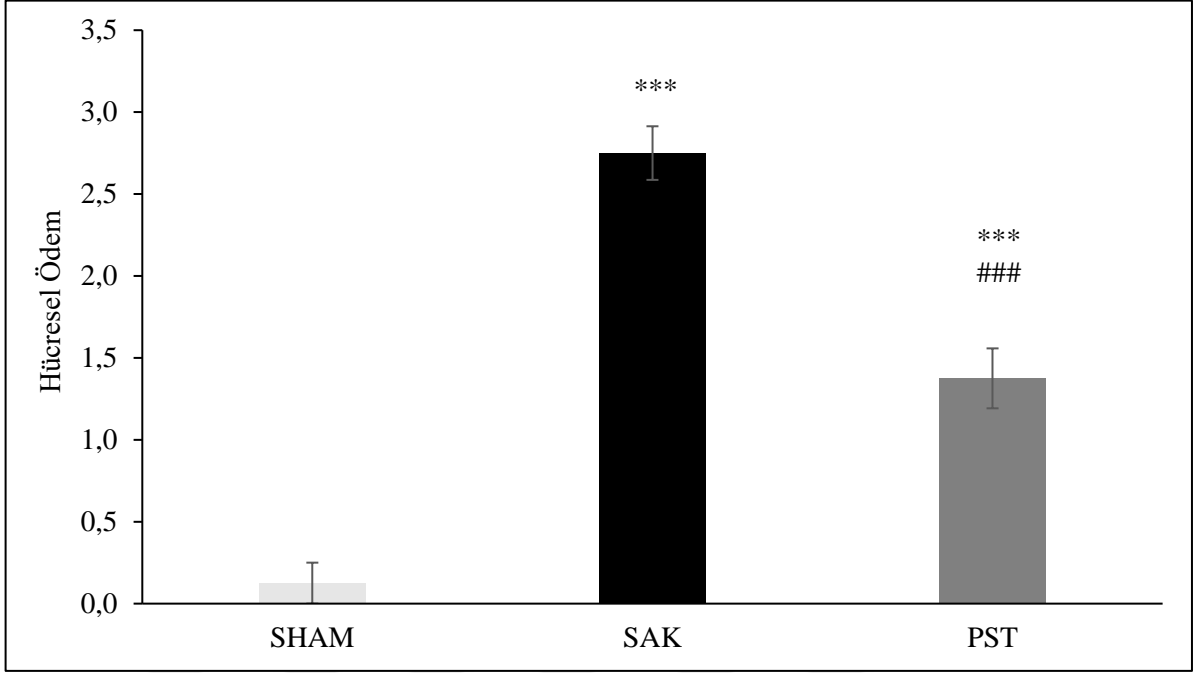
Şekil 32. SAK grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE, 100x). Kırmızı oklar ile ödem alanları, siyah oklar ile de hücresel piknoz gösterilmiştir.



Şekil 33. PST grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (HE, 100x). Kırmızı oklar ile ödem alanları, siyah oklar ile de hücresel piknoz gösterilmiştir.



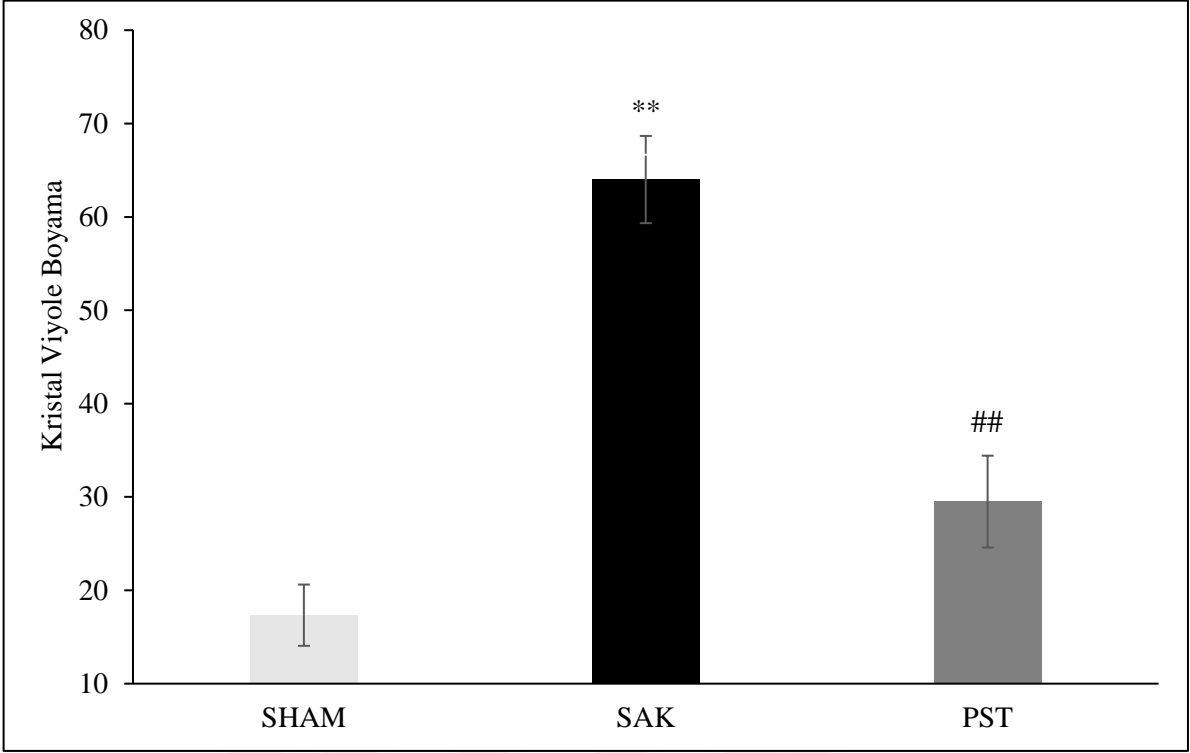
Şekil 34. HE boyaması ile incelenen hücresel piknoz verilerinin karşılaştırılması. **: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$). ***: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$). ###: SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$).



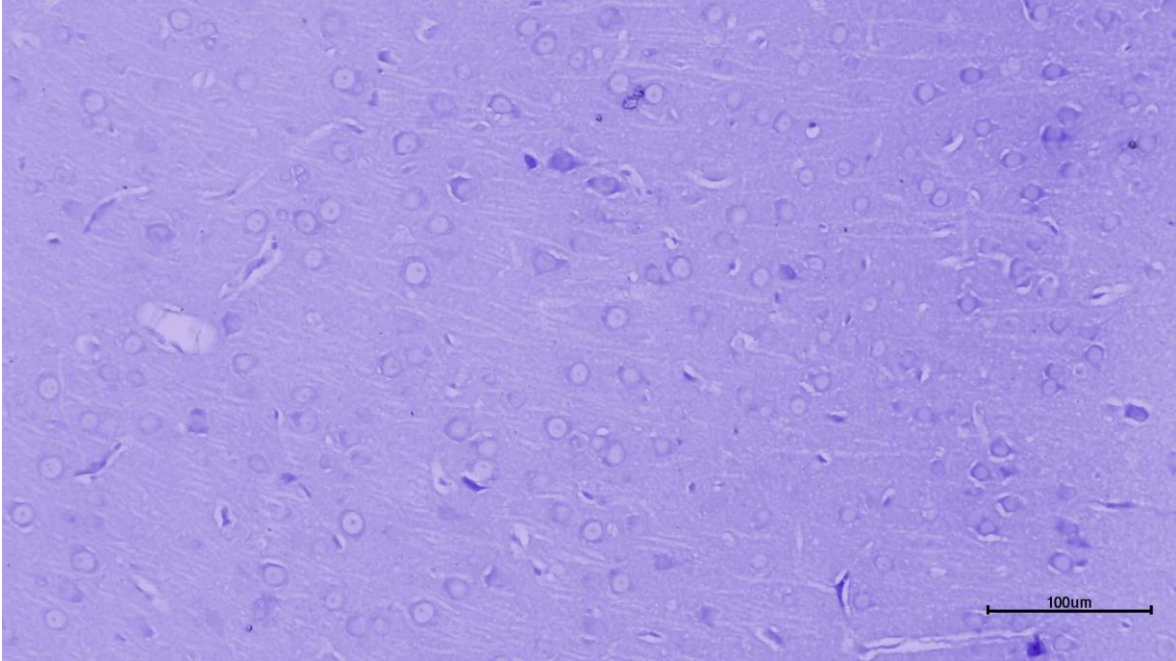
Şekil 35. HE boyaması ile belirlenen hücresel ödem verilerinin karşılaştırılması. ***: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$). ###: SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$).

4.5.2. Kristal viyole boyama bulguları

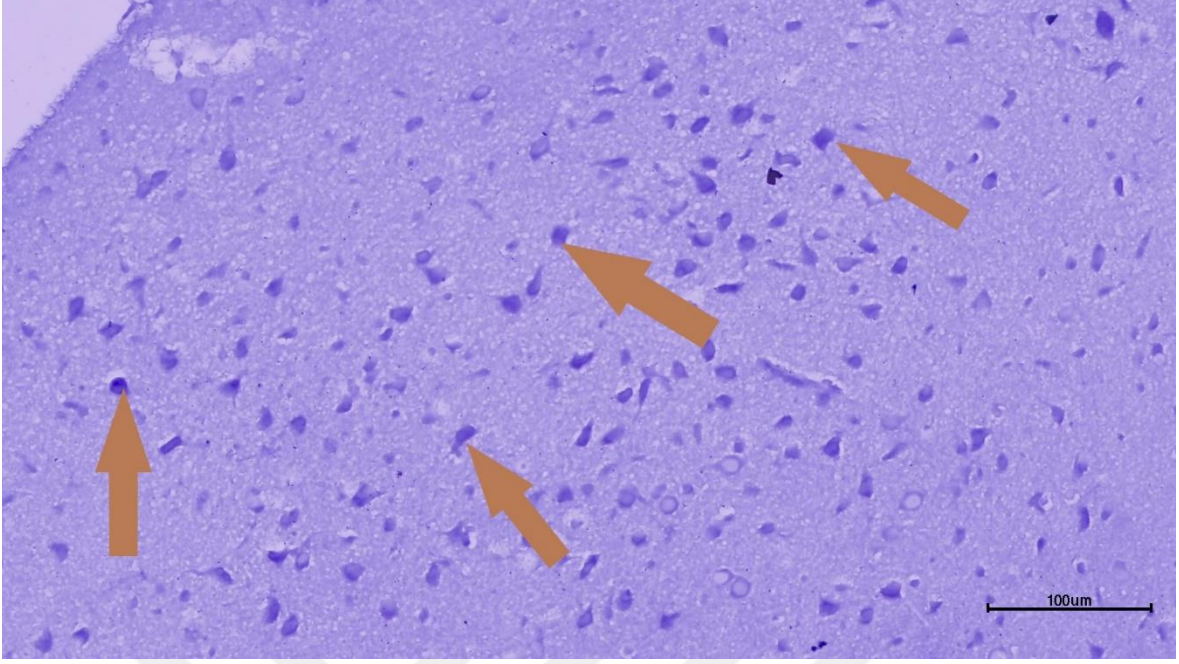
Kristal viyole boyama ile hasarlı hücre sayısı belirlendi. SHAM ve SAK grubu karşılaştırıldığında SAK grubu verilerinde istatistiksel olarak hücre hasarında artış bulundu ($p = 0,01$). SAK ve PST grubu karşılaştırıldığında ise PST grubu verilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlendi ($p < 0,01$). Gruplara ait frontal korteks doku kesitlerinde kristal viyole boyama yapılan örnekler Şekil 37, Şekil 38 ve Şekil 39’te gösterilmiştir.



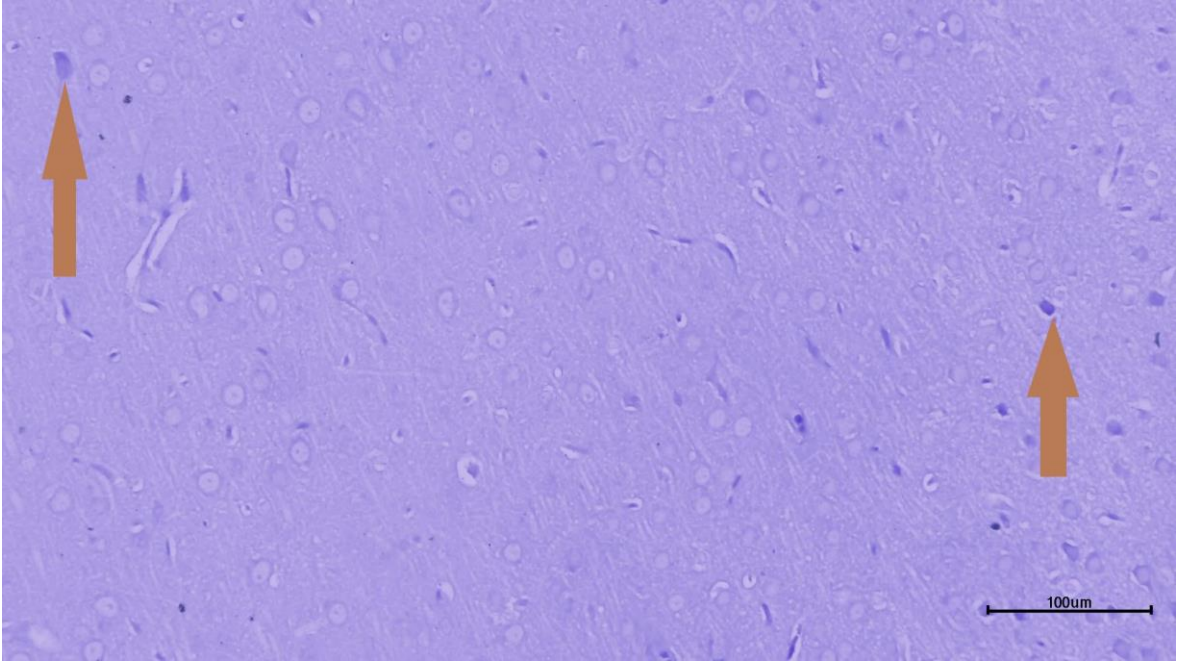
Şekil 36. Kristal Viyole ile boyama verilerinin karşılaştırılması. **: SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,01$). ##: SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$).



Şekil 37. SHAM grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).



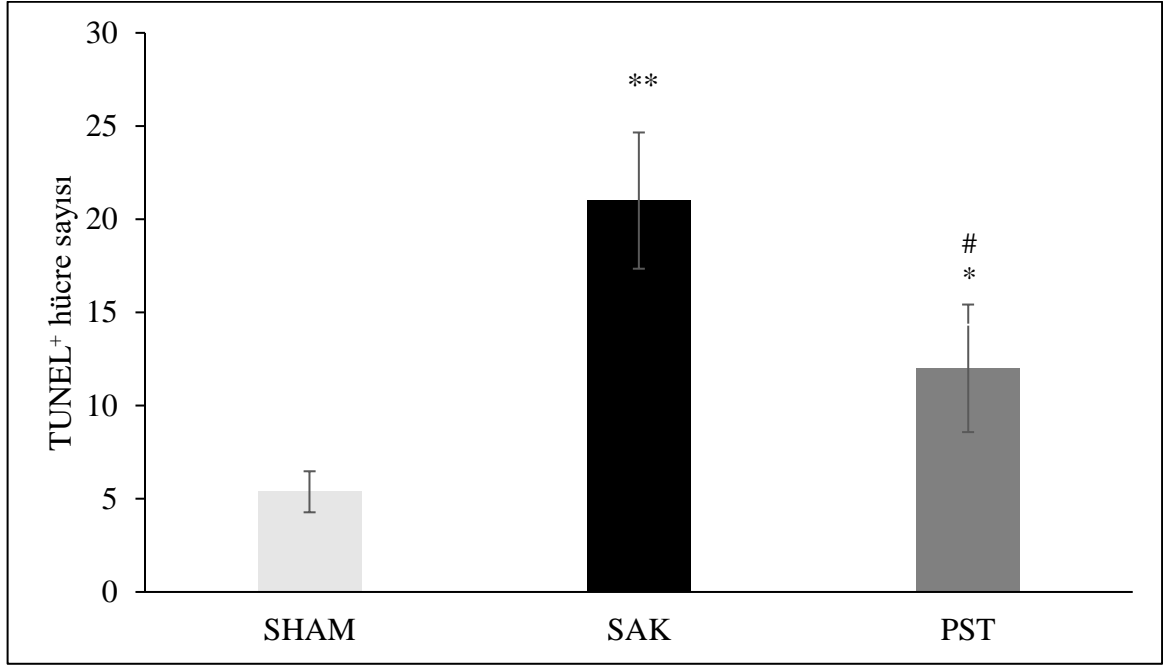
Şekil 38. SAK grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).
Turuncu oklar hasarlı hücreleri göstermektedir.



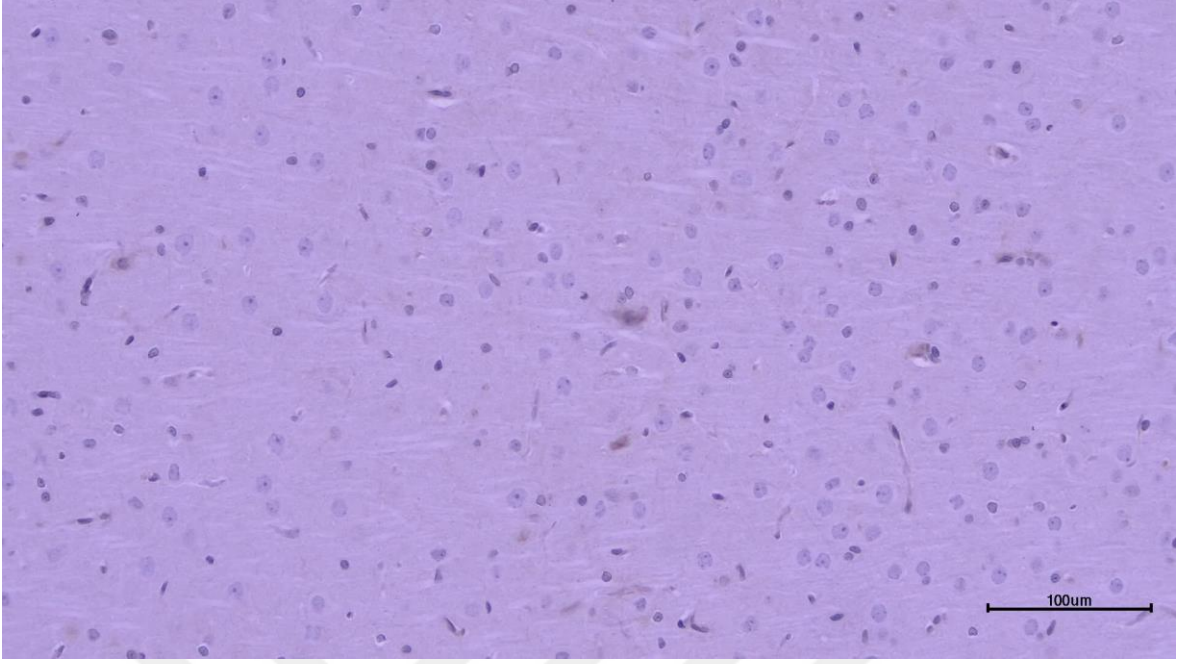
Şekil 39. PST grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (Kristal Viyole, 200x).
Turuncu oklar hasarlı hücreleri göstermektedir.

4.5.3. TUNEL Boyama Bulguları

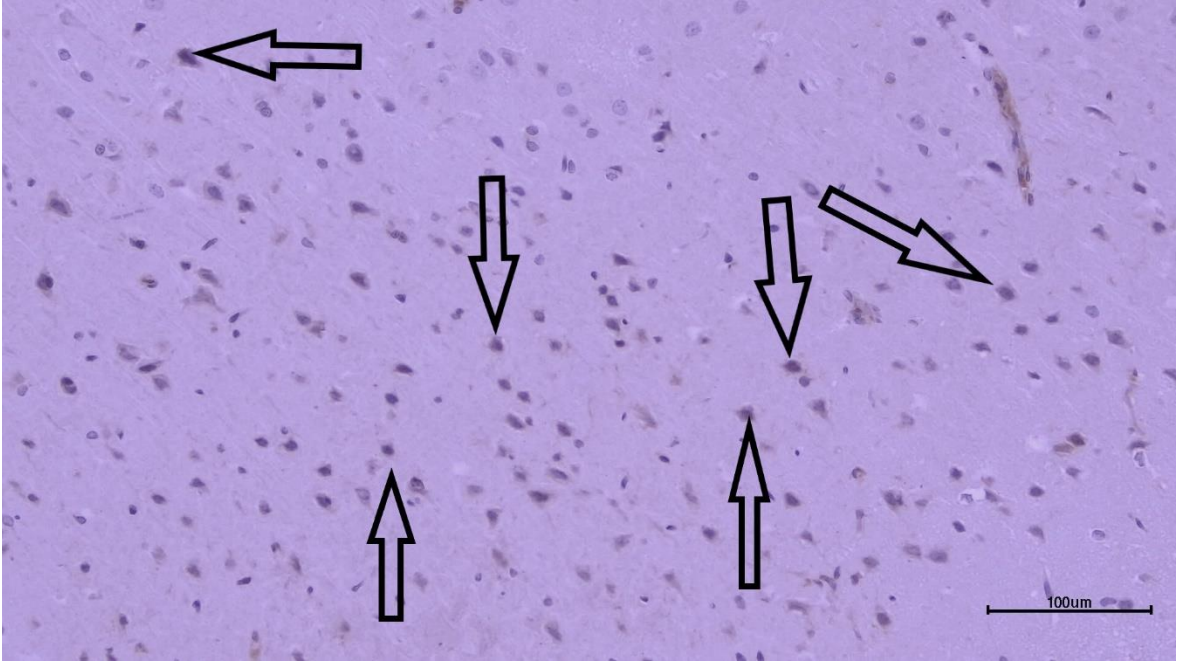
TUNEL boyama yöntemi ile apoptotik hücre sayıları belirlendi. Elde edilen verilere göre hem SAK hem de PST grubunda SHAM grubuna göre TUNEL pozitif hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu anlaşıldı (sırasıyla $p<0,01$ ve $p=0,05$). SAK ve PST grubu verileri karşılaştırıldığında ise TUNEL pozitif hücre miktarının PST grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p=0,05$; Şekil 40). Gruplara ait TUNEL boyama doku kesit örnekleri Şekil 41, Şekil 42 ve Şekil 43'te gösterilmiştir.



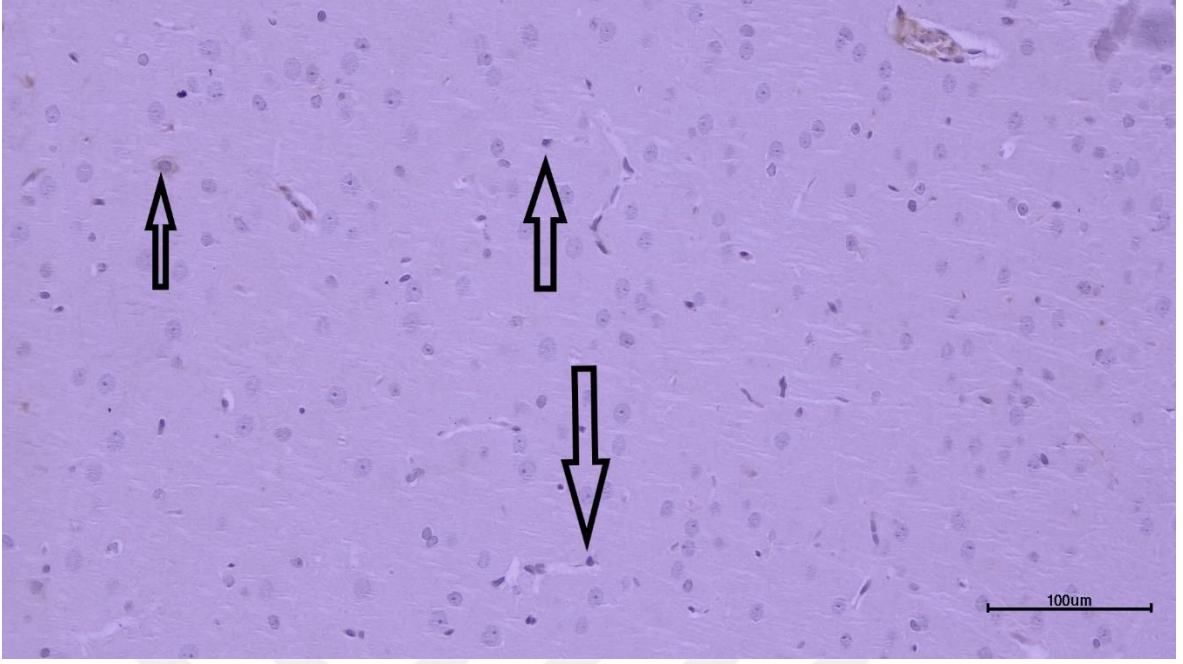
Şekil 40. TUNEL boyama ile belirlenen TUNEL⁺ hücre sayılarının karşılaştırılması. *: SAK grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,05$). **: SHAM grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$). #: SHAM grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,05$).



Şekil 41. SHAM grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (TUNEL, 200x).



Şekil 42. SAK grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (TUNEL, 200x).
Siyah oklar TUNEL⁺ hücreleri göstermektedir.



Şekil 43. PST grubuna ait örnek bir frontal korteks doku kesiti (TUNEL, 200x).
Siyah oklar TUNEL⁺ hücreleri göstermektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Bu çalışma ile deneysel SAK modeli oluşturulan sıçanlarda frontal kortekste ERS üzerine PST'nin iyileştirici etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. SAK sonrası 60. dakikada PST uygulamasının SAK sonrası 24. saatte a) Garcia nörolojik skoru, rotarod testi düşme gecikme süresi ve horizontal bar sonuçları gibi nörodavranışsal test sonuçlarında iyileşmeye b) GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gibi endoplazmik retikulum stresini gösteren gen ekspresyon düzeylerinde azalmaya, c) yangı ve apoptozu gösteren p53 ve NF-κB gen ekspresyonu seviyelerinde düşmeye d) histopatolojik düzeyde piknoz, ödem, kristal viyole boyalı hasarlı hücre sayısında iyileşmeye ve TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar SAK sonrası PST uygulamasının SAK'a bağlı ERS'yi iyileştirebileceğini ve hücre hasarını azaltabileceğini gösteren ilk deneysel bulgulardır.

Çalışmamızda her deney grubunda 8 hayvan kullanıldı. Bunlardan 3 tanesinin total beyin dokusu çıkarılarak ıslak/kuru beyin oranı belirlendi. Kalan beş sıçanın ise frontal korteks bölgeleri çıkarılarak genetik ve histopatolojik analizler gerçekleştirildi.

Çalışmamızda Prunell vd. (2002)'den modifiye edilen SAK modeli uygulandı (Prunell vd., 2002). Uyguladığımız modele göre subaraknoid bölgede kan biriktiği ve SAK modelinin oluştuğunu gösteren verilere ulaşıldı. Çalışma sonucunda hayvanların beyin dokularını aldıktan sonra tüm sıçanların bu bölgelerinde kan birikimi olup olmadığı kontrol edildi. Elde edilen görüntülerden birer örnek Şekil 19'da sunulmuştur. Hem bu gözlem bulguları hem nörolojik skor verileri hem de genetik ve histopatolojik veriler uyguladığımız SAK modelinin başarılı olduğunu düşündürmektedir.

SAK çalışmalarında genel olarak değerlendirilen parametrelerden bir tanesi ölen hayvan sayılarıdır. SAK insanlarda belirli oranda ölümle sonuçlanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda da belirli sayıda hayvanın SAK sonrası öldüğü belirlenmiştir. Nitekim Liang vd. (2018) intraarteriyel perforasyon yöntemi uygulayarak oluşturdukları SAK

modelinde 215 sıçandan 14'ünün operasyon sonrası öldüğünü belirtmişlerdir (Liang vd., 2018). Liu vd.'nin ise 200 µl otolog kan uygulayarak oluşturdukları SAK modelinde 36 sıçandan 3'ü ölmüştür. Bizim çalışmamızda ise SAK'a bağlı herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Bunun nedeni olarak uyguladığımız kan miktarının 120 µl olmasını gösterebiliriz. Çünkü yukarıdaki her iki çalışmada da bizim çalışmamıza göre daha yüksek düzeyde subaraknoid bölgeye kanın ekstrasvazasyonu olmuştur. Dolayısı ile bizim SAK modelimizin şiddetinin orta düzeyde olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışma sonuçlarımızda literatür verileri ile benzer bir farklılık ıslak/kuru beyin oranı verilerinde ortaya çıkmıştır. Xiong vd. (2020) SAK modeli oluşturduktan 48 saat sonra sıçanların beyin dokusunu çıkarıp 100°C'de 48 saat kurutup ıslak/kuru beyin oranını belirlemişlerdir. Çalışma ıslak/kuru beyin oranının SAK grubunda arttığını L-sistein uygulamasının beyin ödemi azalttığını göstermiştir (Xiong vd., 2020). Yan vd. (2016) yaptığı çalışmada ise SAK sonrası 72. saatte beyin dokusu çıkarılıp 4 bölüme ayrılmıştır. Her bölüm ayrı ayrı 105°C'de 72 saat kurutulduktan sonra beyin ödemi ıslak/kuru beyin oran formülü kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmacılar SAK modeliyle bu oranın arttığı göstermiştir. Ayrıca PERK inhibitörü vererek beyin ödeminin azaldığı ortaya konulmuştur (Yan vd., 2016). Qi vd. (2018) ise SAK modeli oluşturdukları sıçanların beyin dokularını SAK sonrası 24. saate çıkarıp 105°C'de 24 saat kuruttuktan sonra formül ile beyin ödemi belirlenmiştir. Bu çalışma ile de beyin ödeminin SAK ile arttığı, atorvastatin verilmesinin beyin ödemi azaltıcı etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Qi vd., 2018). Bizim çalışmamızda da en yüksek ıslak/kuru beyin oranı SAK grubunda belirlenmiş ve PST uygulaması bu oranı azaltıcı etki göstermiştir. Ancak gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark ortaya çıkmamıştır. Bunun nedeninin de yukarıda olduğu gibi uyguladığımız kan miktarına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Diğer taraftan SAK grubundaki beyin dokusu örneklerinde histopatolojik düzeyde ödem tespit ettik. Bu sonuçlar uyguladığımız SAK modelinin histopatolojik düzeyde beyin ödeme yol açtığını ancak total beyin su miktarında anlamlı bir artış yapacak kadar şiddetli olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmada SAK modeli oluşturulmadan önce tüm sıçanların nörodavranışsal test bulguları kaydedildi ve SAK sonrası 24. saat verileri ile karşılaştırıldı. Bu amaçla Garcia nörolojik muayene skoru, rotarod testi düşme gecikme süresi ve horizontal bar skoru belirlendi. Bu testler ile sıçanlarda SAK'a bağlı başta motor yetenekleri olmak üzere

davranışsal değişiklikler olup olmadığının araştırılması ve PST'nin bu değişiklikler üzerine olası iyileştirici etkilerinin araştırılması öngörüldü.

Garcia nörolojik skorları açısından SAK öncesi tüm sıçanların skorları 18 olarak belirlendi. SAK grubunda 24. saatte bu skor 15,5 değerine kadar azaldı. PST uygulanan SAK grubunda ise 16,5 olarak belirlendi. Bu sonuçlar PST uygulamasının SAK sonrası kötüleşen Garcia nörolojik skorunu anlamlı şekilde iyileştirdiğini göstermektedir. Benzer iyileşmeler rotarod testi ve horizontal bar skorlarında da belirlendi. Rotarod testinde 20 rpm hızında SHAM ve PST gruplarındaki tüm sıçanlar maksimum süre olan 180 saniyeyi düşmeden tamamladıkları görülmüş olmasına rağmen SAK grubunda bu süre ortalama 163 saniye olarak belirlendi. Horizontal bar skorları açısından hem 3 hem de 5 mm'lik barlarda en düşük değer yine SAK grubunda belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar PST uygulamasının SAK sonrası bozulan nörolojik verileri anlamlı şekilde iyileştirdiğini göstermiştir.

SAK sonrası nörolojik skor kayıtları hemen hemen tüm SAK çalışmalarında belirlenmektedir. Nörolojik skorlardaki bozulma düzeyi hem SAK'ın ortaya çıkıp çıkmadığı hakkında hem de SAK'ın düzeyi hakkında bilgi vermektedir. Diğer taraftan SAK'ta koruyucu veya tedavi edici ajanların nörolojik skorlar üzerine etkileri de incelenmektedir. SAK sonrası nörolojik skor verileri genellikle 24. saatte kaydedilir. Çünkü en anlamlı değişiklikler bu saatte meydana gelir. Tian vd. (2020) SAK modeli oluşturdukları sıçanlarda Garcia skorlarını 3., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde belirlemişler ve en düşük skoru 24. saatte ölçmüşlerdir. Çalışmalarında 6. saatte azalmaya başlayan Garcia skoru 24. saatte 10 değerine kadar azalmış ve sonra tekrar yükselmeye başlamıştır. Garcia skorundaki bu azalmanın bu saatte ortaya çıkan nöronal apoptoza bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Tian vd., 2020). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Garcia skorunun en düşük olduğu SAK grubunun en yüksek frontal korteks apoptotik hücre sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada yine SAK sonrası 24. saatte Garcia skorunda anlamlı bir azalma belirlenmiş ve TXNIP uygulamasının bu skorda anlamlı bir iyileşme sağladığı belirlenmiştir (Liang vd., 2018).

SAK sonrası 24-72. saatlerde beyinde gerçekleşen patolojik olaylar EBH şeklinde tanımlanmaktadır. EBH'nin altında yatan en önemli mekanizma ise nöronal apoptozdur. Nöronal apoptoz SAK sonrası ortaya çıkan nörolojik bozulmaların ve işlev kayıplarının ana

sorumlusu olarak kabul edilir. Birçok mekanizmanın nöronal apoptozu uyardığı bilinmektedir. Bunlar arasında ROS artması, eksitotoksisite, sinaptik disfonksiyon, bozulmuş protein yıkım sistemleri, ERS, DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyon sayılabilir (Chi vd., 2018). Bu faktörlerden bir tanesi olan ERS son yıllarda SAK sonrası ortaya çıkan nöronal apoptozla ilişkilendirilmiştir. ER işlevlerindeki bozulma katlanmamış proteinlerin birikimine ve sonuç olarak ERS'ye sebep olur. ERS, UPR yolağının aktifleşmesine yol açar. UPR ise PERK ve ATF4 gibi ERS'ye duyarlı proteinleri aktive eder. PERK'in aktivasyonu ER kaynaklı şaperon ve sitokinlerin aktivasyonunu uyarır. Orta düzeyde bir ERS hücrenin hayatta kalmasına yol açarken, ileri düzeyde ve süreklilik arz eden ERS sinir hücresi ölümüne sebep olur. Nakka vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada ERS'nin iskemi/reperfüzyona bağlı sinir hücre ölümlerinde rol aldığını göstermiştir. Çalışmalarında iskemi/reperfüzyon sonrası beyin dokusunda GRP78, CHOP ve ATF4 gen ekspresyon seviyelerinin arttığını ve yüksek düzeyde nöronal hasar ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. UPR'yi azaltmak için seçici bir eIF2 α inhibitörü olan salubrinal uyguladıklarında nöronal hücre ölümünün anlamlı şekilde azaldığını belirlediler (Nakka vd., 2010). Başka bir çalışmada ise zonisamid'in ERS üzerinden nöronal hücre ölümünü azaltıcı etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Parkinson modeli oluşturulan sıçanlarda zonisamid'in CHOP ve kaspaz-3 üzerinden ERS'yi azalttığını ve nöronal hasarı engellediğini ortaya koymuştur (Tsuji vd., 2015). Nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra SAK sonrası artan ERS de nöronal hücre ölümleri ile ilişkilendirilmiştir. Jiang vd. (2021) sıçanlarda serebral korteks dokusunda SAK sonrası GRP78, CHOP ve kaspaz-12 gen ekspresyon düzeylerinin arttığını böylelikle nöronal hücre ölümünün de arttığını göstermişlerdir. Hidrojence zengin salin verilen sıçanlarda nöronal apoptozun iyileştiğini ortaya koymuşlardır (Jiang vd., 2021). Tian vd. (2020) yaptığı bir çalışma da ise SAK sonrası 24. saate TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısının arttığı göstermiştir ayrıca ERS ve apoptozda rol alan GRP78, CHOP, kaspaz-12, ASK1 gen ekspresyon düzeylerinde artışın nöronal apoptozda artışa neden olabileceğini bulunmuştur (Tian vd., 2020). Bizim çalışmamızda da SAK sonrası ERS'nin göstergesi olan GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gen ekspresyonu düzeylerinde artışlar ortaya çıkmış ve PST uygulaması bu artışlara karşı iyileştirici etki göstermiştir. ERS göstergelerinin arttığı gruplarda hem p53 ile NF- κ B hem de apoptotik sinir hücre sayılarının da artmış olduğunu gözlemledik. Bu bulgular literatür bildirimlerine paralel olarak SAK sonrası artan ERS'nin nöronal apoptozu tetiklediğini

göstermektedir. PST uygulaması ERS'yi azaltarak nöronal hasarda iyileştirici bir etki göstermiştir.

Kil vd. (2017) PST'nin ERS üzerindeki rolünü araştırdıkları çalışmalarında hücre kültüründeki endotelial hücrelerde homosistein ile indüklenen ERS'de GRP78 ve CHOP ekspresyon düzeylerinin ve apoptozun arttığını PST uygulamasının ERS'yi ve apoptozu iyileştirici etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Kil vd., 2017). Wen vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise D-GaIN/LPS ile indüklenen karaciğer yetmezliği modelinde CHOP ve IRE1 α gibi ERS belirteçlerinin ekspresyonlarında artış belirlenmiştir. PST verildiğinde ise ERS'nin ve ERS'ye bağlı apoptozun azaldığı belirlenmiştir (Wen vd., 2018). Bununla birlikte PST'nin SAK sonrası EBH üzerine etkileri konusundaki yayınlar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan bir tanesinde PST selektif bir Sky inhibitörü olarak kullanılmış ve SAK'tan 1 saat sonra enjekte edilerek etkileri incelenmiştir (He vd., 2015). Sonuçlar PST'nin p-Syk (fosforile Syk) ve interlökin-1 Beta düzeylerini azaltarak SAK'ta koruyucu bir etki ortaya koyduğunu göstermiştir. Çalışmamızda Syk düzeyleri incelenmemiştir. Ancak inflamatuvar süreçleri gösterebilecek bir parametre olarak sadece NF- κ B gen ekspresyonları incelenmiştir. SAK sonrası artan NF- κ B gen ekspresyonu düzeylerinin PST uyguladığımız grupta yaklaşık % 50 düzeyinde azalmış olması yukarıdaki literatür bilgisine benzer şekilde PST'nin bizim çalışmamızda da inflamatuvar süreçleri inhibe ettiğini düşündürmüştür. PST'nin NF- κ B'yi inhibe edici etkisi başka bir çalışmada ortaya konulmuştur (Zhou vd., 2022). Çalışma sonuçlarına göre PST'nin beyin dokusunda ortaya çıkan ve beyin hasarına karşı koruyucu olduğu düşünülen antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin NF- κ B inhibisyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmada, PST'nin beyin hücreleri üzerine etkisi lipopolisakkaritle indüklenen inflamasyonda incelenmiştir. İn vitro düzeyde yürütülen ve PST'nin kan beyin bariyerindeki bozulmayı azaltarak beyni hasara karşı koruyucu etki gösterebileceği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise PST'nin beyinde iskemi/reperfüzyon modelinde koruyucu etkileri incelenmiştir (Wang vd., 2020). PST bir SIRT1 aktivatörü olarak bilinir. SIRT1'in aktivasyonu ise antioksidan ve antiapoptotik faktörlerin sentezini uyararak hücreleri hasara karşı korur (Lee vd.,2019; Llarena vd., 2016). Çalışma sonuçları beyin iskemi/reperfüzyon modelinde PST'nin gösterdiği antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini SIRT1 aktivasyonunu ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd., 2020). PST beyin hasarı üzerine koruyucu etki gösterdiğine dair yukarıda verilen çalışmalar bulunmakla birlikte PST'nin SAK'taki etkilerini inceleyen sadece bir adet çalışmaya rastlanılmıştır. Bununla

birlikte PST bir RES analogu olarak bilinir ve RES'in hem beyin hasarı hem de SAK'taki rolü konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Resveratrolün SAK modelinde hem çok yüksek hem de düşük dozda uygulandığı bir çalışmada antiapoptotik etkisinin ancak yüksek dozda ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Çalışmada RES bu etkisini Akt yolağını inhibe ederek göstermiştir (Zhou vd., 2014). Başka bir çalışmada ise RES SAK sonrası artan oksidatif stresle birlikte ERS'yi de azaltıcı etki göstermiştir (Xie vd., 2019). Çalışmada RES'in etkisi bizim çalışmamıza benzer şekilde prefrontal kortekste incelenmiştir. Resveratrol SAK sonrası artan CHOP ve GRP78 düzeylerini anlamlı şekilde azaltıcı etki göstermiştir. SAK'ta artan ROS birikimi ERS'ye ve apoptoza giden süreçleri tetikler. Bir antioksidan olan resveratrol bu özelliği sayesinde ERS'yi azaltıcı etki gösterir. Son yıllarda resveratrolün yerine başka birçok dokuda daha güçlü etki gösterdiği düşünülen PST kullanımı yaygınlaşmıştır. Çalışmamızda resveratrole benzer şekilde PST'nin de SAK sonrası artan ERS göstergelerinden CHOP, GRP78, ATF4 ve PERK gen ekspresyon düzeylerini azalttığı anlaşılmıştır. PST aynı zamanda TUNEL pozitif hücre sayılarında da azalmaya sebep olmuştur. Bu veri PST'nin SAK'a bağlı apoptozu da azalttığını göstermektedir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar PST'nin SAK sonrası bozulan nörolojik skorları düzelttiğini, apoptozu azalttığını ve ERS'deki bozulmaya karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu kanaate ulaşmamızı sağlayan bulgular aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir;

1. PST uygulaması beyin ödeminde azalmaya yol açmıştır.
2. Nörodavranışsal değerlendirme skoru olan Garcia nörolojik skoru SAK ile artmış olup PST verilen grupta iyileşme meydana gelmiştir.
3. Diğer bir nörodavranışsal değerlendirme testi olan rotarod testi sonuçlarında ise sıçanların 20 rpm hızda SAK ile birlikte düşme sürelerinin azaldığı, PST uygulaması ile birlikte düşme gecikmesinin arttığı, denge ve lokomotor yeteneklerinin iyileştiği ortaya konmuştur.

4. Nörodavranışsal değerlendirmeler testlerinden sonuncusu olan horizontal bar skorlamasında SAK ile azalan skor PST ile artmıştır.
5. ERS göstergelerinden olan GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gen ekspresyon düzeylerinde SAK ile birlikte artış meydana gelmiştir. Bu artış SAK ile birlikte ERS'nin ortaya çıktığını göstermektedir ve PST ile bu genlerin ekspresyon düzeylerinde azalma ise ERS'nin azaldığını ortaya koymaktadır.
6. ERS'ye bağlı ortaya çıkan apoptozda rol alan p53 ve NF-κB gen ekspresyon düzeyleri SAK modeli sonucu artmış ve PST uygulamasının SAK'a bağlı ortaya çıkan ERS ve apoptozu iyileştirebileceği gösterilmiştir.
7. Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda HE boyama ile hücresel piknoz ve ödem değerlendirildi ve SAK'ın iki parametreyi de arttırdığı ve de PST'nin bu artışı önemli bir seviyede azalttığı bulunmuştur.
8. Kristal Viyole boyama ile hasarlı hücre sayıları belirlenmiştir. SAK ile artan hasarlı hücre sayısı PST uygulaması sonrasında azaldığı belirlenmiştir.
9. Son olarak TUNEL boyama ile apoptoz belirteci olan TUNEL⁺ hücre sayıları belirlendi. SAK sonrası ortaya çıkan ERS'ye bağlı apoptozu ortaya koyan TUNEL⁺ hücre sayılarında artış olduğu, PST'nin ise bu durumu iyileştirdiği gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar SAK sonrası artan ERS üzerine PST'nin koruyucu etki gösterdiğine dair ilk bulgulardır. Bu bulgulardan yola çıkarak, SAK tedavisinde PST'nin bir adjuvant ajan olarak kullanım potansiyeli olduğu söylenebilir. Altta yatan diğer mekanizmaların da ortaya konulması için yeni çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., & Molinari, M. (2010). "N-glycan structures: recognition and processing in the ER". *Trends in biochemical sciences*, 35(2), 74–82.
- Ahn, S. H., Savarraj, J. P., Pervez, M., Jones, W., Park, J., Jeon, S. B., Kwon, S. U., Chang, T. R., Lee, K., Kim, D. H., Day, A. L., & Choi, H. A. (2018). "The Subarachnoid Hemorrhage Early Brain Edema Score Predicts Delayed Cerebral Ischemia and Clinical Outcomes". *Neurosurgery*, 83(1), 137–145.
- Appenzeller-Herzog C. (2011). "Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum". *Journal of cell science*, 124(Pt 6), 847–855.
- Appenzeller-Herzog, C., & Ellgaard, L. (2008). "The human PDI family: versatility packed into a single fold". *Biochimica et biophysica acta*, 1783(4), 535–548.
- Ashikawa, K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A. C., Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2002). "Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation". *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 169(11), 6490–6497.
- Ayer, R. E., & Zhang, J. H. (2008). "Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm". In *Cerebral Vasospasm* (pp. 33-41). Springer, Vienna.
- Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E., & Sommer, T. (2011). "Protein dislocation from the ER". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(3), 925-936.
- Bederson, J. B., Germano, I. M., & Guarino, L. (1995). "Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat". *Stroke*, 26(6), 1086-1092.

- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response". *Nature cell biology*, 2(6), 326-332.
- Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1496-1500.
- Bonfanti, R., Colombo, C., Nocerino, V., Massa, O., Lampasona, V., Iafusco, D., Viscardi, M., Chiumello, G., Meschi, F., & Barbetti, F. (2009). "Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies". *Diabetes care*, 32(1), 123–125.
- Bonita, R., & Thomson, S. (1985). "Subarachnoid hemorrhage: epidemiology, diagnosis, management, and outcome". *Stroke*, 16(4), 591-594.
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). "Protein folding in the endoplasmic reticulum". *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a013201.
- Braakman, I., Hoover-Litty, H., Wagner, K. R., & Helenius, A. (1991). "Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum". *The Journal of cell biology*, 114(3), 401–411.
- Brenjian, S., Moini, A., Yamini, N., Kashani, L., Faridmojtahedi, M., Bahramrezaie, M., Khodarahmian, M., & Amidi, F. (2020). "Resveratrol treatment in patients with polycystic ovary syndrome decreased pro-inflammatory and endoplasmic reticulum stress markers". *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y.: 1989), 83(1), e13186.
- Brodsky, J. L. (2007). "The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation)". *Biochemical Journal*, 404(3), 353-363.
- Burdukiewicz, M., Sobczyk, P., Chilimoniuk, J., Gagat, P., & Mackiewicz, P. (2018). Prediction of signal peptides in proteins from malaria parasites. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3709.

- Cahill, J., Calvert, J. W., & Zhang, J. H. (2006). "Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(11), 1341–1353.
- Carvalho, P., Goder, V., & Rapoport, T. A. (2006). "Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins". *Cell*, 126(2), 361-373.
- Chai, W. N., Bu, Y. F., Wu, Z. M., Xie, Y. F., Shi, Q. H., Dan, W., ... & Jiang, L. (2022). "Neat1 decreases neuronal apoptosis after oxygen and glucose deprivation". *Neural regeneration research*, 17(1), 163.
- Chambers, J. E., & Marciniak, S. J. (2014). "Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *American journal of physiology*". *Cell physiology*, 307(8), C657–C670.
- Chapman, E., Fry, A. N., & Kang, M. (2011). "The complexities of p97 function in health and disease". *Molecular bioSystems*, 7(3), 700-710.
- Chen, S., Wu, H., Tang, J., Zhang, J., & Zhang, J. H. (2015). "Neurovascular events after subarachnoid hemorrhage: focusing on subcellular organelles". *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage*, 39-46.
- Chen, X., Wang, J., Gao, X., Wu, Y., Gu, G., Shi, M., ... & Zhang, J. (2020). "Tauroursodeoxycholic acid prevents ER stress-induced apoptosis and improves cerebral and vascular function in mice subjected to subarachnoid hemorrhage". *Brain Research*, 1727, 146566.
- Chi, H., Chang, H. Y., & Sang, T. K. (2018). "Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases". *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3082.

- Chung, C. L., Wu, C. H., Huang, Y. H., Wu, S. C., Chai, C. Y., Tsai, H. P., & Kwan, A. L. (2022). "Blocking Hepatoma-Derived Growth Factor Attenuates Vasospasm and Neuron Cell Apoptosis in Rats Subjected to Subarachnoid Hemorrhage". *Translational stroke research*, 13(2), 300–310.
- Chung, K. T., Shen, Y., & Hendershot, L. M. (2002). "BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP". *The Journal of biological chemistry*, 277(49), 47557–47563.
- Cnop, M., Foufelle, F., & Velloso, L. A. (2012). "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes". *Trends in molecular medicine*, 18(1), 59–68.
- Culmsee, C., & Mattson, M. P. (2005). "p53 in neuronal apoptosis". *Biochemical and biophysical research communications*, 331(3), 761-777.
- Deacon, R. M. (2013). Measuring motor coordination in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (75), e2609.
- D'Alessio, C., Caramelo, J. J., & Parodi, A. J. (2010). "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control". *Seminars in cell & developmental biology*, 21(5), 491–499.
- de Oliveira Manoel, A. L., Goffi, A., Marotta, T. R., Schweizer, T. A., Abrahamson, S., & Macdonald, R. L. (2016). "The critical care management of poor-grade subarachnoid haemorrhage". *Critical care (London, England)*, 20, 21.
- de Rooij, N. K., Linn, F. H., van der Plas, J. A., Algra, A., & Rinkel, G. J. (2007). "Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends". *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(12), 1365–1372.
- Denic, V., Quan, E. M., & Weissman, J. S. (2006). "A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation". *Cell*, 126(2), 349-359.
- Dietrich, H. H., & Dacey, R. G., Jr (2000). "Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm". *Neurosurgery*, 46(3), 517–530.

- Ding, B., Kull, B., Liu, Z., Mottagui-Tabar, S., Thonberg, H., Gu, H. F., Brookes, A. J., Grundemar, L., Karlsson, C., Hamsten, A., Arner, P., Ostenson, C. G., Efendic, S., Monné, M., von Heijne, G., Eriksson, P., & Wahlestedt, C. (2005). "Human neuropeptide Y signal peptide gain-of-function polymorphism is associated with increased body mass index: possible mode of function". *Regulatory peptides*, 127(1-3), 45–53.
- Ding, K., Xu, J., Wang, H., Zhang, L., Wu, Y. ve Li, T. (2015). "Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice". *Neurochemistry International*, 91, 46-54.
- Dobson, C. M., Šali, A., & Karplus, M. (1998). "Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment". *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 37(7), 868–893.
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. E. (2008). "ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C". *Molecular biology of the cell*, 19(6), 2620–2630.
- Doyle, K. M., Kennedy, D., Gorman, A. M., Gupta, S., Healy, S. J., & Samali, A. (2011). "Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders". *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(10), 2025-2039.
- Dufey, E., Sepúlveda, D., Rojas-Rivera, D., & Hetz, C. (2014). "Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview". *American journal of physiology. Cell physiology*, 307(7), C582–C594.
- Dupzyk, A., & Tsai, B. (2016). How polyomaviruses exploit the ERAD machinery to cause infection. *Viruses*, 8(9), 242.
- Ellgaard, L., & Ruddock, L. W. (2005). "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties". *EMBO reports*, 6(1), 28–32.
- Endo, H., Nito, C., Kamada, H., Yu, F., & Chan, P. H. (2006). "Akt/GSK3beta survival signaling is involved in acute brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats". *Stroke*, 37(8), 2140–2146.

Endoplazmik Retikulumun 3D Yapısı? (12.11.2022). Erişim adresi:
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.pinterest.com%2Fpin%2Fintroduction-of-endoplasmic-reticulum--563372234632702614%2F&psig=A0vVaw1yOqzmpzu5MbwpYLSfO4UX&ust=1680924966716000&source=images&cd=vfe&ved=0CBIQjhxqFwoTCKCUr-Hrlv4CFQAAAAAdAAAAABAD>.

Ernst, R., Mueller, B., Ploegh, H. L., & Schlieker, C. (2009). "The otubain YOD1 is a deubiquitinating enzyme that associates with p97 to facilitate protein dislocation from the ER". *Molecular cell*, 36(1), 28-38.

Evans, E. A., Gilmore, R., & Blobel, G. (1986). "Purification of microsomal signal peptidase as a complex". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(3), 581–585.

Feigin, V. L., Lawes, C. M., Bennett, D. A., Barker-Collo, S. L., & Parag, V. (2009). "Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review". *The Lancet. Neurology*, 8(4), 355–369.

Feigin, V. L., Norrving, B., & Mensah, G. A. (2017). "Global Burden of Stroke". *Circulation research*, 120(3), 439–448.

Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). "Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review". *Food Chemistry*, 130, 797-813.

Gaasch, M., Schiefecker, A. J., Kofler, M., Beer, R., Rass, V., Pfausler, B., Thomé, C., Schmutzhard, E., & Helbok, R. (2018). "Cerebral Autoregulation in the Prediction of Delayed Cerebral Ischemia and Clinical Outcome in Poor-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Patients". *Critical care medicine*, 46(5), 774–780.

Gale, M., Jr, Blakely, C. M., Hopkins, D. A., Melville, M. W., Wambach, M., Romano, P. R., & Katze, M. G. (1998). "Regulation of interferon-induced protein kinase PKR: modulation of P58IPK inhibitory function by a novel protein, P52rIPK". *Molecular and cellular biology*, 18(2), 859–871.

- Gao, C., Liu, W., Sun, Z. D., Zhao, S. G., & Liu, X. Z. (2009). "Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway". *BMC Neurosci*, 10, 7.
- Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. ve Hu, X. J. (1995). "Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation". *Stroke*, 26(4), 627-635.
- Gharibani, P., Modi, J., Menzie, J., Alexandrescu, A., Ma, Z., Tao, R., ... & Wu, J. Y. (2015). "Comparison between single and combined post-treatment with S-Methyl-N, N-diethylthiolcarbamate sulfoxide and taurine following transient focal cerebral ischemia in rat brain". *Neuroscience*, 300, 460-473.
- Ghemrawi, R., & Khair, M. (2020). "Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases". *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6127.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). "Missing pieces in the NF- κ B puzzle". *cell*, 109(2), S81-S96.
- Gilmore, R., Blobel, G., & Walter, P. (1982). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle". *The Journal of cell biology*, 95(2 Pt 1), 463–469.
- Grinna, L. S., & Robbins, P. W. (1979). "Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides". *The Journal of biological chemistry*, 254(18), 8814–8818.
- Grote, E., & Hassler, W. (1988). "The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage". *Neurosurgery*, 22(4), 654–661.
- Gundu, C., Arruri, V. K., Sherkhane, B., Khatri, D. K., & Singh, S. B. (2022). "GSK2606414 attenuates PERK/p-eIF2 α /ATF4/CHOP axis and augments mitochondrial function to mitigate high glucose induced neurotoxicity in N2A cells". *Current research in pharmacology and drug discovery*, 3, 100087.

- Guo, D., Xie, J., Zhao, J., Huang, T., Guo, X., & Song, J. (2018). "Resveratrol protects early brain injury after subarachnoid hemorrhage by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the Akt/mTOR pathway". *Neuroreport*, 29(5), 368.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response". *Molecular cell*, 5(5), 897-904.
- He, Y., Xu, L., Li, B., Guo, Z. N., Hu, Q., Guo, Z., Tang, J., Chen, Y., Zhang, Y., Tang, J., & Zhang, J. H. (2015). "Macrophage-Inducible C-Type Lectin/Spleen Tyrosine Kinase Signaling Pathway Contributes to Neuroinflammation After Subarachnoid Hemorrhage in Rats". *Stroke*, 46(8), 2277–2286.
- Hebert, D. N., Garman, S. C., & Molinari, M. (2005). "The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags". *Trends in cell biology*, 15(7), 364–370.
- Hegde, R. S., & Bernstein, H. D. (2006). "The surprising complexity of signal sequences". *Trends in biochemical sciences*, 31(10), 563–571.
- Hegde, R. S., & Ploegh, H. L. (2010). "Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum". *Current opinion in cell biology*, 22(4), 437–446.
- Helenius, A., & Aebi, A. M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291(5512), 2364-2369.
- Hendershot L. M. (2004). "The ER function BiP is a master regulator of ER function". *The Mount Sinai journal of medicine*, New York, 71(5), 289–297.
- Hetz, C., Chevet, E., & Harding, H. P. (2013). "Targeting the unfolded protein response in disease". *Nature reviews Drug discovery*, 12(9), 703-719.
- Hosoda, R., Hamada, H., Uesugi, D., Iwahara, N., Nojima, I., Horio, Y., & Kuno, A. (2021). "Different antioxidative and antiapoptotic effects of piceatannol and resveratrol". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 376(3), 385-396.

- Hu, H., Tian, M., Ding, C., & Yu, S. (2019). "The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection". *Frontiers in immunology*, 9, 3083.
- Hughes, D., & Mallucci, G. R. (2019). "The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway". *The FEBS journal*, 286(2), 342–355.
- Hutt, D., & Balch, W. E. (2010). "The proteome in balance". *Science*, 329(5993), 766-767.
- Ikawa, F., Michihata, N., Matsushige, T., Abiko, M., Ishii, D., Oshita, J., Okazaki, T., Sakamoto, S., Kurogi, R., Iihara, K., Nishimura, K., Morita, A., Fushimi, K., Yasunaga, H., & Kurisu, K. (2020). "In-hospital mortality and poor outcome after surgical clipping and endovascular coiling for aneurysmal subarachnoid hemorrhage using nationwide databases: a systematic review and meta-analysis". *Neurosurgical review*, 43(2), 655–667.
- Jiang, B., Li, Y., Dai, W., Wu, A., Wu, H., & Mao, D. (2021). "Hydrogen-rich saline alleviates early brain injury through regulating of ER stress and autophagy after experimental subarachnoid hemorrhage". *Acta Cirúrgica Brasileira*, 36.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K., & Hendershot, L. M. (2008). "Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP". *The EMBO journal*, 27(21), 2873–2882.
- Kalariya, N. M., Shoeb, M., Reddy, A. B., Sawhney, R., & Ramana, K. V. (2013). "RETRACTED: Piceatannol suppresses endotoxin-induced ocular inflammation in rats".
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. Nature reviews". *Molecular cell biology*, 11(8), 579–592.
- Kil, J. S., Jeong, S. O., Chung, H. T., & Pae, H. O. (2017). "Piceatannol attenuates homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and endothelial cell damage via heme oxygenase-1 expression". *Amino Acids*, 49(4), 735-745.

- Kowalski, R. G., Claassen, J., Kreiter, K. T., Bates, J. E., Ostapkovich, N. D., Connolly, E. S., & Mayer, S. A. (2004). "Initial misdiagnosis and outcome after subarachnoid hemorrhage". *JAMA*, 291(7), 866–869.
- Kreiter, K. T., Copeland, D., Bernardini, G. L., Bates, J. E., Peery, S., Claassen, J., Du, Y. E., Stern, Y., Connolly, E. S., & Mayer, S. A. (2002). "Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage". *Stroke*, 33(1), 200–208.
- Krishnamurthi, R. V., Feigin, V. L., Forouzanfar, M. H., Mensah, G. A., Connor, M., Bennett, D. A., Moran, A. E., Sacco, R. L., Anderson, L. M., Truelsen, T., O'Donnell, M., Venketasubramanian, N., Barker-Collo, S., Lawes, C. M., Wang, W., Shinohara, Y., Witt, E., Ezzati, M., Naghavi, M., Murray, C., ... GBD Stroke Experts Group (2013). "Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010". *The Lancet. Global health*, 1(5), e259–e281.
- Kusaka, G., Ishikawa, M., Nanda, A., Granger, D. N., & Zhang, J. H. (2004). "Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(8), 916-925.
- Lederkremer G. Z. (2009). "Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation". *Current opinion in structural biology*, 19(5), 515–523.
- Lee, H. J., Kang, M. G., Cha, H. Y., Kim, Y. M., Lim, Y., & Yang, S. J. (2019). "Effects of piceatannol and resveratrol on sirtuins and hepatic inflammation in high-fat diet-fed mice". *Journal of medicinal food*, 22(8), 833-840.
- Lee, J. Y., He, Y., Sagher, O., Keep, R., Hua, Y., & Xi, G. (2009). "Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage". *Brain research*, 1287, 126–135.
- Lee, S. O., Cho, K., Cho, S., Kim, I., Oh, C., & Ahn, K. (2010). "Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation". *The EMBO journal*, 29(2), 363-375.

- Li, J., Chen, J., Mo, H., Chen, J., Qian, C., Yan, F., ... & Chen, G. (2016). "Minocycline protects against NLRP3 inflammasome-induced inflammation and P53-associated apoptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2668-2678.
- Li, J., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). "Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53". *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7260-7270.
- Li, Y., Tang, J., H Khatibi, N., Zhu, M., Chen, D., Zheng, W., & Wang, S. (2010). "Ginsenoside RB1 reduces neurologic damage, is anti-apoptotic, and down-regulates p53 and BAX in subarachnoid hemorrhage". *Current neurovascular research*, 7(2), 85-94.
- Liang, J., Yin, C., Doong, H., Fang, S., Peterhoff, C., Nixon, R. A., & Monteiro, M. J. (2006). "Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation". *Journal of cell science*, 119(19), 4011-4024.
- Liang, Y., Che, X., Zhao, Q., Darwazeh, R., Zhang, H., Jiang, D., ... & He, Z. (2019). "Thioredoxin-interacting protein mediates mitochondrion-dependent apoptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Molecular and Cellular Biochemistry*, 450(1), 149-158.
- Lim, P. J., Danner, R., Liang, J., Doong, H., Harman, C., Srinivasan, D., ... & Monteiro, M. J. (2009). "Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD". *Journal of Cell Biology*, 187(2), 201-217.
- Lin, W. C., Chuang, Y. C., Chang, Y. S., Lai, M. D., Teng, Y. N., Su, I. J., ... & Hung, J. H. (2012). Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NF- κ B activation.
- Liu, C. L., Li, X., Hu, G. L., Li, R. J., He, Y. Y., Zhong, W., ... & Wang, L. L. (2012). "Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway". *Journal of geriatric cardiology: JGC*, 9(3), 258.

- Liu, M., Zhong, W., Li, C., & Su, W. (2022). "Fluoxetine attenuates apoptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage through Notch1/ASK1/p38 MAPK signaling pathway". *Bioengineered*, 13(4), 8396-8411.
- Liu, Q., Zhao, D., Ji, Y. X., Huang, X. Y., Yang, P., Wang, Y. Z., & Lei, T. (2016). "Role of glucose-regulated protein 78 in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats". *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 36(2), 168-173.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). "NF-κB signaling in inflammation". *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023.
- Liu, X., Chen, Y., Wang, H., Wei, Y., Yuan, Y., Zhou, Q., ... & Li, X. (2021). Microglia-derived IL-1β promoted neuronal apoptosis through ER stress-mediated signaling pathway PERK/eIF2α/ATF4/CHOP upon arsenic exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 125997.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Llarena, M., Andrade, F., Hasnaoui, M., Portillo, M. P., Pérez-Matute, P., Arbones-Mainar, J. M., ... & Aldámiz-Echevarría, L. (2016). "Potential renoprotective effects of piceatannol in ameliorating the early-stage nephropathy associated with obesity in obese Zucker rats". *Journal of physiology and biochemistry*, 72, 555-566.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudarra P. (2011). *Moleküler Hücre Biyolojisi*. Hikmet Geçkil, Murat Özmen, Özfer Yeşilada (çev.). Palme Yayınları
- Macdonald, R. L., & Schweizer, T. A. (2017). "Spontaneous subarachnoid haemorrhage". *The Lancet*, 389(10069), 655-666.
- Mak, B. C., Wang, Q., Laschinger, C., Lee, W., Ron, D., Harding, H. P., ... & McCulloch, C. A. (2008). "Novel function of PERK as a mediator of force-induced apoptosis". *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23462-23472.

- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., ... & Ron, D. (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum". *Genes & development*, 18(24), 3066-3077.
- Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T., & Hendershot, L. M. (2002). "A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins". *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4456–4469.
- Mikulski, D., Górnjak, R., & Molski, M. (2010). "A theoretical study of the structure–radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment". *European journal of medicinal chemistry*, 45(3), 1015-1027.
- Molinari M. (2007). "N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal". *Nature chemical biology*, 3(6), 313–320.
- Nakagawa, T., & Yuan, J. (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis". *The Journal of cell biology*, 150(4), 887-894.
- Nakka, V. P., Prakash-Babu, P., & Vemuganti, R. (2016). "Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress, and Autophagy: Potential Therapeutic Targets for Acute CNS Injuries". *Molecular neurobiology*, 53(1), 532–544.
- Osowski, C. M., & Urano, F. (2011). "Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system". *Methods in enzymology*, 490, 71–92
- Ostrowski, R. P., Colohan, A. R., & Zhang, J. H. (2005). "Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage". *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(5), 554–571.
- Ostrowski, R. P., Colohan, A. R., & Zhang, J. H. (2006). "Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Neurological research*, 28(4), 399–414.

- Ovali, M. A. ve Uzun, M. (2017). "The effects of melatonin administration on KCNQ and KCNH2 gene expressions and QTc interval in pinealectomised rats". *Cellular and Molecular Biology*, 63(3), 45-50.
- Park, S., Yamaguchi, M., Zhou, C., Calvert, J. W., Tang, J., & Zhang, J. H. (2004). "Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage". *Stroke*, 35(10), 2412-2417.
- Paschen, W., & Mengesdorf, T. (2005). "Cellular abnormalities linked to endoplasmic reticulum dysfunction in cerebrovascular disease--therapeutic potential". *Pharmacology & therapeutics*, 108(3), 362–375.
- Petrova, K., Oyadomari, S., Hendershot, L. M., & Ron, D. (2008). "Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3". *The EMBO journal*, 27(21), 2862–2872.
- Piersma, D., Berns, E. M., Verhoef-Post, M., Uitterlinden, A. G., Braakman, I., Pols, H. A., & Themmen, A. P. (2006). "A common polymorphism renders the luteinizing hormone receptor protein more active by improving signal peptide function and predicts adverse outcome in breast cancer patients". *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(4), 1470–1476.
- Piotrowska, H., Kucinska, M., & Murias, M. (2012). "Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol". *Mutation research*, 750(1), 60–82.
- Potter, M. D., & Nicchitta, C. V. (2000). "Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane". *The Journal of biological chemistry*, 275(43), 33828–33835.
- Prunell, G. F., Mathiesen, T., Diemer, N. H., & Svendgaard, N. A. (2003). "Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models". *Neurosurgery*, 52(1), 165–176.

- Qi, W., Cao, D., Li, Y., Peng, A., Wang, Y., Gao, K., ... & Wu, Y. (2018). "Atorvastatin ameliorates early brain injury through inhibition of apoptosis and ER stress in a rat model of subarachnoid hemorrhage". *Bioscience reports*, 38(3).
- Rapoport T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes". *Nature*, 450(7170), 663–669.
- Ren, H., Zhai, W., Lu, X., & Wang, G. (2021). The cross-links of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 691881.
- Rinkel, G. J., Djibuti, M., Algra, A., & van Gijn, J. (1998). "Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review". *Stroke*, 29(1), 251–256.
- Ron, D., & Walter, P. (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response". *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), 519–529.
- Rossi, M., Caruso, F., Opazo, C., & Saliccioli, J. (2008). "Crystal and molecular structure of piceatannol; scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals and docking with transthyretin". *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10557–10566.
- Rubovitch, V., Barak, S., Rachmany, L., Goldstein, R. B., Zilberstein, Y., & Pick, C. G. (2015). "The neuroprotective effect of salubrinal in a mouse model of traumatic brain injury". *Neuromolecular medicine*, 17(1), 58–70.
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (2009). "Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms". *Cell*, 136(2), 272–283.
- Rutkevich, L. A., & Williams, D. B. (2011). "Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum". *Current opinion in cell biology*, 23(2), 157–166.
- Rutkowski, D. T., & Hegde, R. S. (2010). "Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response". *Journal of Cell Biology*, 189(5), 783-794.

- Savoia D. (2012). “Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics”. *Future microbiology*, 7(8), 979–990.
- Schäfer, A., & Wolf, D. H. (2009). “Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery”. *The EMBO journal*, 28(19), 2874-2884.
- Schatlo, B., Fung, C., Stienen, M. N., Fathi, A. R., Fandino, J., Smoll, N. R., Zumofen, D., Daniel, R. T., Burkhardt, J. K., Bervini, D., Marbacher, S., Reinert, M., D Alonzo, D., Ahlborn, P., Mendes Pereira, V., Roethlisberger, M., Seule, M., Kerkeni, H., Remonda, L., Weyerbrock, A., ... Schaller, K. (2021). “Incidence and Outcome of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: The Swiss Study on Subarachnoid Hemorrhage (Swiss SOS)”. *Stroke*, 52(1), 344–347.
- Schönthal A. H. (2012). “Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy”. *Scientifica*, 2012, 857516.
- Schuberth, C., & Buchberger, A. (2008). “UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97”. *Cellular and molecular life sciences*, 65(15), 2360-2371.
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). “The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling”. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(1), 79–94.
- Seiser, R. M., & Nicchitta, C. V. (2000). “The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis”. *The Journal of biological chemistry*, 275(43), 33820–33827.
- Sekijima, Y., Wiseman, R. L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S. R., Sawkar, A. R., ... & Kelly, J. W. (2005). “The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease”. *Cell*, 121(1), 73-85.
- Senol, N., Oguzoglu, A. S., Erzurumlu, Y., Asci, H., Savran, M., Gulle, K., ... & Goksel, H. M. (2021). “Modulation of Salubrinal-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress in an Experimental Subarachnoid Hemorrhage Model”. *World Neurosurgery*, 153, e488-e496.

- Shang, X., Lin, K., Yu, R., Zhu, P., Zhang, Y., Wang, L., ... & Chen, K. (2019). "Resveratrol protects the myocardium in sepsis by activating the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and inhibiting the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway". *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 9290.
- Shao, Z., Wu, P., Wang, X., Jin, M., Liu, S., Ma, X., & Shi, H. (2018). "Tetramethylpyrazine Protects Against Early Brain Injury and Inhibits the PERK/Akt Pathway in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage". *Neurochemical research*, 43(8), 1650–1659.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals". *Developmental cell*, 3(1), 99-111.
- Shen, Y., & Hendershot, L. M. (2005). "ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates". *Molecular biology of the cell*, 16(1), 40–50.
- Shibatani, T., David, L. L., McCormack, A. L., Frueh, K., & Skach, W. R. (2005). "Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits". *Biochemistry*, 44(16), 5982–5992.
- Shimizu, Y., Okuda-Shimizu, Y., & Hendershot, L. M. (2010). "Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids". *Molecular cell*, 40(6), 917-926.
- Simpson, K. J. (1999). "Cytokines, for better or worse?". *European journal of gastroenterology & hepatology*, 11(9), 957-966.
- Siwecka, N., Rozpędek, W., Pytel, D., Wawrzynkiewicz, A., Dziki, A., Dziki, Ł., ... & Majsterek, I. (2019). Dual role of endoplasmic reticulum stress-mediated unfolded protein response signaling pathway in carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4354.

- Sögüt, Ö (2017). “Nasetilsistein’in Yetmezliğinde ve Akut Karaciğer Antibiyoterapiye Destek Amacıyla Kullanımı”, ATUDER Kapadokya Toksikoloji Sempozyumu,20-23 Ekim 2017, Kapadokya.
- Soldà, T., Galli, C., Kaufman, R. J., & Molinari, M. (2007). “Substrate-specific requirements for UGT1-dependent release from calnexin”. *Molecular cell*, 27(2), 238–249.
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). “Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system”. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-18.
- Subaraknoid Kanama? (12.11.2022). Erişim adresi:
<https://draliyilmaz.com/blog/subaraknoid-kanama>.
- Sun, C. M., Enkhjargal, B., Reis, C., Zhou, K. R., Xie, Z. Y., Wu, L. Y., ... & Zhang, J. H. (2019). “Osteopontin attenuates early brain injury through regulating autophagy-apoptosis interaction after subarachnoid hemorrhage in rats”. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(10), 1162-1172.
- Sundström, J., Söderholm, M., Söderberg, S., Alfredsson, L., Andersson, M., Bellocco, R., Björck, M., Broberg, P., Eriksson, M., Eriksson, M., Forsberg, B., Fransson, E. I., Giedraitis, V., Theorell-Haglöw, J., Hallqvist, J., Hansson, P. O., Heller, S., Håkansson, N., Ingelsson, M., Janson, C., ... Wiberg, B. (2019). “Risk factors for subarachnoid haemorrhage: a nationwide cohort of 950 000 adults”. *International journal of epidemiology*, 48(6), 2018–2025.
- Tatar, M., & Tatar, T. (2018). “Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar”. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 41(3), 294-303.
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S. H., Deak, P. M., Kostova, Z., & Wolf, D. H. (2003). “Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD”. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35903-35913.

- Tian, X. S., Xu, H., He, X. J., Li, Y., He, B., & Zhao, D. (2020). “Endoplasmic reticulum stress mediates cortical neuron apoptosis after experimental subarachnoid hemorrhage in rats”. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(7), 1569.
- Tsujii, S., Ishisaka, M., Shimazawa, M., Hashizume, T., & Hara, H. (2015). “Zonisamide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell damage in vitro and in vivo”. *European journal of pharmacology*, 746, 301-307.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). “Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1”. *Science*, 287(5453), 664-666.
- Ushioda, R., & Nagata, K. (2011). “The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5”. *Methods in enzymology*, 490, 235–258.
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D. Y., & Nagata, K. (2008). “ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER”. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5888), 569–572.
- van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. (2009). “Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver?”. *Apoptosis*, 14(12), 1424-1434.
- van Gijn, J., Kerr, R. S., & Rinkel, G. J. (2007). “Subarachnoid haemorrhage”. *Lancet (London, England)*, 369(9558), 306–318.
- Vashist, S., & Ng, D. T. (2004). “Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control”. *The Journal of cell biology*, 165(1), 41-52.
- Vlak, M. H., Algra, A., Brandenburg, R., & Rinkel, G. J. (2011). “Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis”. *The Lancet. Neurology*, 10(7), 626–636.

- Wahdan, S. A., Azab, S. S., Elsherbiny, D. A., & El-Demerdash, E. (2019). "Piceatannol protects against cisplatin nephrotoxicity via activation of Nrf2/HO-1 pathway and hindering NF- κ B inflammatory cascade". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(11), 1331-1345.
- Wahlman, J., DeMartino, G. N., Skach, W. R., Bulleid, N. J., Brodsky, J. L., & Johnson, A. E. (2007). "Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system". *Cell*, 129(5), 943-955.
- Walter, P., & Blobel, G. (1981). "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein". *The Journal of cell biology*, 91(2 Pt 1), 551–556.
- Wang, K. J., Zhang, W. Q., Liu, J. J., Cui, Y., & Cui, J. Z. (2020). Piceatannol protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via the Sirt1/FoxO1 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 22(6), 5399-5411.
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2016). "Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease". *Nature*, 529(7586), 326–335.
- Wang, Z., Lu, Y. L., Chen, M., Xu, H. F., & Zheng, L. R. (2022). "Piceatannol alleviates glucolipotoxicity induced vascular barrier injury through inhibition of the ROS/NF- κ B signaling pathway". *American Journal of Translational Research*, 14(1), 120.
- Wen, J., Lin, H., Zhao, M., Tao, L., Yang, Y., Xu, X., ... & Weng, D. (2018). "Piceatannol attenuates D-GalN/LPS-induced hepatotoxicity in mice: Involvement of ER stress, inflammation and oxidative stress". *International Immunopharmacology*, 64, 131-139.
- Willer, M., Forte, G. M., & Stirling, C. J. (2008). "Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY". *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33883-33888.

- Williams D. B. (2006). “Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum”. *Journal of cell science*, 119(Pt 4), 615–623.
- Wiseman, R. L., Powers, E. T., Buxbaum, J. N., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2007). “An adaptable standard for protein export from the endoplasmic reticulum”. *Cell*, 131(4), 809-821.
- Xie, Y. K., Zhou, X., Yuan, H. T., Qiu, J., Xin, D. Q., Chu, X. L., ... & Wang, Z. (2019). “Resveratrol reduces brain injury after subarachnoid hemorrhage by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress”. *Neural Regeneration Research*, 14(10), 1734.
- Xiong, Y., Xin, D. Q., Hu, Q., Wang, L. X., Qiu, J., Yuan, H. T., ... & Wang, Z. (2020). “Neuroprotective mechanism of L-cysteine after subarachnoid hemorrhage”. *Neural regeneration research*, 15(10), 1920.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). “Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions”. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2656–2664.
- Xu, W., Gao, L., Li, T., Zheng, J., Shao, A., & Zhang, J. (2018). “Apelin-13 alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and blood–brain barrier disruption: possible involvement of ATF6/CHOP pathway”. *Neuroscience*, 388, 284-296.
- Yan, F., Cao, S., Li, J., Dixon, B., Yu, X., Chen, J., Gu, C., Lin, W., & Chen, G. (2017). “Pharmacological Inhibition of PERK Attenuates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Rats Through the Activation of Akt”. *Molecular neurobiology*, 54(3), 1808–1817.
- Yan, F., Li, J., Chen, J., Hu, Q., Gu, C., Lin, W., & Chen, G. (2014). “Endoplasmic reticulum stress is associated with neuroprotection against apoptosis via autophagy activation in a rat model of subarachnoid hemorrhage”. *Neuroscience letters*, 563, 160-165.

- Yan, W., Frank, C. L., Korth, M. J., Sopher, B. L., Novoa, I., Ron, D., & Katze, M. G. (2002). "Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15920–15925.
- Yin, C., Huang, G. F., Sun, X. C., Guo, Z., & Zhang, J. H. (2016). "Tozasertib attenuates neuronal apoptosis via DLK/JIP3/MA2K7/JNK pathway in early brain injury after SAH in rats". *Neuropharmacology*, 108, 316-323.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor". *Cell*, 107(7), 881-891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2001). "Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response". *Molecular and cellular biology*, 21(4), 1239–1248.
- You, W., Zuo, G., Shen, H., Tian, X., Li, H., Zhu, H., ... & Wang, Z. (2016). "Potential dual role of nuclear factor-kappa B in experimental subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury in rabbits". *Inflammation Research*, 65(12), 975-984.
- Yu, S., Zeng, Y. J., & Sun, X. C. (2018). "Neuroprotective effects of p53/microRNA-22 regulate inflammation and apoptosis in subarachnoid hemorrhage". *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 2406-2412.
- Zahedi, R. P., Völzing, C., Schmitt, A., Frien, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A., & Zimmermann, R. (2009). "Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7". *Proteomics*, 9(13), 3463–3473.
- Zhang, J., Dong, X. J., Ding, M. R., You, C. Y., Lin, X., Wang, Y., ... & Wang, G. D. (2020). "Resveratrol decreases high glucose-induced apoptosis in renal tubular cells via suppressing endoplasmic reticulum stress". *Molecular Medicine Reports*, 22(5), 4367-4375.

- Zhao, Q., Che, X., Zhang, H., Fan, P., Tan, G., Liu, L., ... & He, Z. (2017). "Thioredoxin-interacting protein links endoplasmic reticulum stress to inflammatory brain injury and apoptosis after subarachnoid haemorrhage". *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 1-15.
- Zhou, C., Yamaguchi, M., Colohan, A. R., & Zhang, J. H. (2005). "Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage". *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(5), 572–582.
- Zhou, X. M., Zhou, M. L., Zhang, X. S., Zhuang, Z., Li, T., Shi, J. X., & Zhang, X. (2014). "Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model". *Journal of Surgical Research*, 189(1), 159-165.
- Zhou, Y., Khan, H., Hoi, M. P. M., & Cheang, W. S. (2022). "Piceatannol Protects Brain Endothelial Cell Line (bEnd.3) against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress". *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4), 1206. <https://doi.org/10.3390/molecules27041206>.
- Ziu, E., Suheb, M. K., & Mesfin, F. (2022). "Subarachnoid hemorrhage". *StatPearls*.
- Zubkov, A. Y., Tibbs, R. E., Clower, B., Ogihara, K., Aoki, K., & Zhang, J. H. (2001). "Apoptosis in basilar endothelial cells in a canine double hemorrhage model". *Acta neurochirurgica. Supplement*, 77, 29–31.

EKLER

EK 1

ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Karar Tarihi : 05.03.2021

Karar No :2021/02

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:05.03.2021
TOPLANTI SAYISI	:2021/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	:2021- 2100030793
KARAR NUMARASI	:2021/02-08
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Yüksek Lisans Öğrencisi Berna ÖZBEY
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	: Rat (<i>Wistar albino</i>) – 27+15 adet erkek

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Metehan UZUN, tarafından Etik Kurulumuza sunulan “Deneysel Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Piseatannolün Beyinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.