



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ MODELİ UYGULANAN
SIÇANLARDA PHOENIXIN 14'ÜN BEYİN ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DAMLA ANIL ÇELEBİ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK AKAKIN
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ MODELİ UYGULANAN
SIÇANLARDA PHOENIXIN 14'ÜN BEYİN ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DAMLAM ANIL ÇELEBİ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK AKAKIN
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

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

Damla ANIL ÇELEBİ

TEŞEKKÜR

Tüm eğitimim boyunca akademik uygulama anlayışında engin tecrübe ve bilgisini bilimsel çerçeve içerisinde aktarmayı ilke edinmiş, geleceğe yönelik öngörüsüyle ilke ve prensipler doğrultusunda hedeflerimi işaretleyen ve bu yolda bitmez fedakârlıklarını karşılıksız sunan ve yardımlarını esirgemeyen başta sevgili ve değerli danışman hocam Prof. Dr. Dilek AKAKIN'a,

Anabilim dalımızda bizleri her zaman bir bütün halinde organize ederek birlik ve beraberlik içerisinde nezih ve disiplinli bir çalışma ortamı sağlayan ve akademik kariyerimin başlaması için gerekli temelleri atmama yardımcı olan saygın hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Feriha ERCAN'a,

Yine aynı bilgelik, incelik ve dostça yaklaşımları ile değerli bilgilerinden benden esirgemeyen histolojinin esaslarını araştırma teknikleri ile özelleştirmemi sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Şule ÇETİNEL, Prof. Dr. Serap ŞİRVANCI, Doç. Dr. Özlem Tuğçe ÇİLİNGİR KAYA, Doç. Dr. Merve AÇIKEL ELMAS ve Dr. Öğr. Üyesi Dila ŞENER AKÇORA'ya,

Tez deneylerimde değerli bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, takıldığım her aşamada yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Berrak YEĞEN, Dr. Leyla Semiha ŞEN, Prof. Dr. Meral YÜKSEL, Prof. Dr. Oya ORUN'a,

Berber çalışmaktan keyif aldığım değerli asistan arkadaşlarım Leman ARSLAN ARITÜRK, Damla KAYALI, Gülseren ALTAY AZNAVUR, Ayça KARAGÖZ KÖROĞLU Kutay KÖROĞLU, Fatma Bedia KARAKAYA ÇİMEN Nur ÖZKEÇECİ, Barış UYANIK Rümeyza ÇELEBİ, Yasemin CESUR, Hilal ÜNLÜ, Rana BİLGİN TAŞDEMİR, Menekşe EMET, Ahmet Furkan OZAN'A,

Çalışmamın en başından beri her zaman desteğini gördüğüm, varlığını hissettiğim, çok sevdiğim ve bir ömür seveceğim güzel kızım Leyla ÇELEBİ'ye,

Desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyip bu günlere gelmemdeki en büyük paya sahip değerli ailem Şakir ANIL, Zeynep ANIL, Sima ANIL, Mehmet BİTKİN ve sevgili eşim Cahit ÇELEBİ'ye,

TDK-2022-10776 numaralı tez projemi destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na ve 2024S555 numaralı 1002 Hızlı Destek projemi destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	3
TABLO LİSTESİ.....	4
1. ÖZET	5
2. SUMMARY	6
3. GİRİŞ VE AMAÇ	7
4. GENEL BİLGİLER	9
4.1. Beyin.....	9
4.2. Serebral Korteks	10
4.3. Serebrum Kanlanması.....	12
4.4. İnme	14
4.5. İskemi-Reperfüzyon	14
4.5.1. Serebral İskemi	17
4.5.2. Serebral İskemi patofizyolojisi.....	18
4.5.3. Serebral İskemi Modelleri	19
4.5.3.1. Global serebral iskemi modeli.....	20
4.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	21
4.7. Nöropeptitler.....	23
4.7.1. Phoenixin-14.....	23
5. GEREÇ VE YÖNTEM	26
5.1. Deney Hayvanları	26
5.2. Global Serebral İskemi Modeli	26
5.3. Phoenixin 14 Tedavisi	26
5.4. Nörolojik Hasar Değerlendirmesi.....	27
5.5. Davranış Testleri.....	27
5.5.1. Lokomotor Aktivite Testi	28
5.5.2. Rotarod testi.....	28
5.5.3. Pati Dokunma Testi	28
5.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	28
5.6.1. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü.....	29
5.6.2. Lipit Peroksidasyonu ve Glutasyon tayini	29
5.6.3. Reaktif Oksijen Türleri Aktivite değerlendirme.....	29
5.7. Işık Mikroskopik İncelemeler.....	29
5.7.1. Mikroskopik Preparasyon ve Değerlendirmeler.....	29
5.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	30
5.8. İstatistiksel Analizler	31
6. BULGULAR	32
6.1. Nörolojik Hasar Değerlendirmesi.....	32

6.2.	Davranış Testleri.....	32
6.2.1.	Lokomotor Aktivite Değerlendirmesi	32
6.2.2.	Rotarod Testi	33
6.2.3.	Pati Dokunma Testi	34
6.3.	Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	34
6.3.1.	Miyeloperoksidaz Aktivitesi	34
6.3.2.	Lipit Peroksidasyonu ve Glutasyon Aktivitesi.....	35
6.3.3.	Kemilüminesans Ölçümleri	35
6.4.	Histopatolojik Bulgular	36
6.5.	İmmünohistokimyasal Bulgular	38
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ	44
8.	KAYNAKLAR.....	50

KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	:	Adenozin 3- trifosfat
AMPA	:	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
BDNF	:	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Cas-3	:	Kaspaz-3,
CGRP	:	Kalsitonin gen ilişkili peptit
DETAE	:	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Enstitüsü
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
GFAP	:	Glial Fibriler Asidik Protein
GnRH	:	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	:	Glutatyon
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
H ₂ O	:	Su
HMGB1	:	Yüksek mobilite grubu kutu 1
IL-1 β	:	İnterlökin-1 β
I/R	:	İskemi/Reperfüzyon Grubu
İcv	:	İntraserebroventriküler
LP	:	Lipit peroksidasyonu
MPO	:	Miyeloperoksidaz
MCAO	:	Orta serebral arter oklüzyonu
NMDA	:	N-metil D-aspartat
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Nrf2	:	Nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NOX1	:	NADPH oksidaz 1
O ₂	:	Oksijen
O ₂ ⁻	:	Süperoksit radikalleri

OGD	:	Oksijen-Glikoz yoksunluğu
OGD/R	:	Oksijen-Glikoz yoksunluğu/Reperfüzyon
PNX-14	:	Phoenixin 14
PNX-5	:	5µg/kg PNX-14 Uygulanan Grup
PNX-25	:	25µg/kg PNX-14 Uygulanan Grup
PNX-50	:	50µg/kg PNX-14 Uygulanan Grup
PaO ₂	:	Hücrede oksijen basıncı
PFK	:	Fosfofruktokinaz
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SOD ₂	:	Mitokondriyal süperoksit dismutaz
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TNF- α	:	Tümör nekroz faktörü- α
UV	:	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Şekil 1.	Serebral Korteks Beyin Lobları (Gould, 2024). 9
Şekil 2.	Beyin korteksi, gri madde. boya:Cajal Yöntemi (Eroschenko Ve Fiore, 2013) 11
Şekil 3.	Kortikal Vasküler Alanlar (Cruces Ve Ark., 2022). 13
Şekil 4.	İskemik Kaskad Aşamaları. 15
Şekil 5.	İskemi Hasarının Oluşum Süreçleri. 16
Şekil 6.	Deney Grupları Nörolojik Muayene Değişimi. 32
Şekil 7.	Deney Grupları Dolaşma Mesafeleri. 33
Şekil 8.	Deney Grupları Rotarod Cihazında Kalma Süreleri. 33
Şekil 9.	Deney Grupları Pati Dokunma Yüzdeleri. 34
Şekil 10.	Deney Grupları Mpo Aktivitesi. 34
Şekil 11.	Deney Grupları Lp Düzeyleri. 35
Şekil 12.	Deney Grupları Gsh Düzeyleri. 35
Şekil 13.	Deney Grupları Lusigenin Düzeyleri. 36
Şekil 14.	Deney Grupları Luminol Düzeyleri. 36
Şekil 15.	Deney Gruplarına Ait Histopatolojik Değerlendirme. 37
Şekil 16.	Deney Gruplarına Ait Gfap İmmünreaktivite Değerlendirmesi. 38
Şekil 17.	Deney Gruplarına Ait Cas-3 İmmünreaktivite Değerlendirmesi. 39
Şekil 18.	Deney Grupları Bdnf İmmünreaktivite Değerlendirmesi. 41
Şekil 19a-b.	Yarı İnce Epon Kesitler. Toluidin Mavisini. 42

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	Bedersonun Modifiye Nörolojik Muayene Puanlaması.	27
-----------------	--	----

1. ÖZET

Tezin başlığı: Deneysel Serebral İskemi Modeli Uygulanan Sıçanlarda Phoenixin 14'ün Beyin Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Damla ANIL ÇELEBİ

Danışmanın Adı Soyadı: Prof. Dr. Dilek AKAKIN

Programın Adı: Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı

Amaç: Çalışmamızda, hipotalamus-hipofiz-gonadal ekseninde yer alan Phoenixin-14 (PNX-14) peptidinin sıçanlarda oluşturulan akut serebral iskemi-reperfüzyon modelinde olası koruyucu etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ketamin (100 mg/kg) anestezisi altında erkek Wistar sıçanların (n=40), karotis communis arterine mikrovasküler klemp ile geçici iskemi uygulandı. 30 dakikalık iskemi sürecinin ardından klemp çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Kesi kapatıldıktan sonra farklı dozlarda (5, 25, 50 µg/kg) PNX-14, cilt altına uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise sham cerrahi işlemi gerçekleştirildi. Reperfüzyonun 20. saatinde enjeksiyonlar tekrarlandı. Nörolojik hasar değerlendirmesi tamamlandıktan sonra davranış testleri gerçekleştirildi. 24. saatte sıçanlar dekapite edildi ve beyin dokusu örneklerinde biyokimyasal, morfolojik, immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi ve gruplar kendi aralarında değerlendirildi.

Bulgular: İskemi/Reperfüzyon (İ/R) grubunda artan nörolojik hasar skoru ($p<0,0001$), PNX-14 tedavili tüm gruplarda azaldı ($p<0,001$). İ/R grubunda azalan rotarod testi süresi ($p<0,05$), PNX-14 (50µg/kg) grubunda arttı ($p<0,01$). Lokomotor aktivite testinde katedilen mesafe İ/R grubunda azalırken ($p<0,05$), PNX-14 tedavi gruplarında anlamlı bir farklılık görülmedi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda MPO, LP ve GSH düzeyi artarken PNX-14 tedavi gruplarında azaldı ($p<0,05$). İ/R grubunda artan ($p<0,0001$) doku Reaktif Oksijen Türleri (ROT) miktarı, histopatolojik hasar skoru, Kaspaz-3 ve Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) immünreaktiviteyi, tüm PNX-14 tedavi gruplarında azaldı ($p<0,05-0,0001$). İ/R grubunda azalmış ($p<0,05$) Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) immünreaktivitesi PNX-14 ile tedavi edilen gruplarda arttı ($p<0,05-0,001$).

Sonuç Sonuçlarımız, PNX-14'ün akut iskemi-reperfüzyona bağlı gelişen nörolojik hasarı azalttığı davranış testleri, biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Bu sonuçlar serebral iskemi-reperfüzyon hasarına karşı yeni bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-reperfüzyon, Phoenixin-14, beyin

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of the Effects of Phoenixin-14 on the Brain Tissues of Rats Induced with Experimental Cerebral Ischemia Model

Student Name, Surname: Damla ANIL ÇELEBİ

Supervisor Name : Prof. Dilek AKAKIN

Program Name : Histology and Embryology PhD Program

Objective: In our study, we aimed to investigate the possible protective effect of Phoenixin-14 (PNX-14) peptide, which is located in the hypothalamus-pituitary-gonadal axis, in the acute cerebral ischemia-reperfusion model created in rats.

Materials and Methods: Under ketamine (100 mg/kg) anesthesia of male Wistar rats (n=40), transient ischemia was applied onto carotid communis with a microvascular clamp and 30 minutes later clamp was removed for reperfusion. Incision was closed, PNX-14 (5,25,50 µg/kg) was subcutaneously administered. Sham-surgery was applied to control group. Injections were repeated at 20th hour. After the neurological damage examination was completed, behavioral tests were performed. At 24th hours, the rats were decapitated. Then biochemical, morphological, immunohistochemical analyses were performed on brain tissue samples and the groups were evaluated among themselves.

Results: The neurological damage score increased in the Ischemia/Reperfusion (I/R) group ($p<0.0001$), and decreased in all PNX-14 treated groups ($p<0.0001$). The rotarod test duration decreased in the I/R group ($p<0.05$), and increased in the PNX-14 (50µg/kg) group ($p<0.01$). The distance covered in the locomotor activity test decreased in the I/R group ($p<0.05$), and there was no significant difference was observed in the PNX-14 treatment groups. Compared to the control group, the increased MPO, LP and GSH levels in the I/R group decreased in the PNX-14 treated groups ($p<0.05$). The elevated levels of tissue ROS, histopathological damage scores, Caspase-3, and GFAP immunoreactivities in the I/R group ($p<0.0001$) decreased across all PNX-14 treatment groups. ($p<0.05-0.0001$). BDNF immunoreactivity, which decreased in the I/R group ($p<0.05$), increased in the PNX-14-treated groups ($p<0.05-0.001$).

Conclusion: Our results show that PNX-14 reduces neurological damage caused by acute ischemia-reperfusion using behavioral tests, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyses. These results are thought to be a new treatment option against cerebral ischemia-reperfusion injury.

Keywords: Ischemia-reperfusion, Phoenixin-14, brain

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya genelinde yaygın bir nörolojik hastalık olan iskemik inme, her yıl binlerce kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Bu nörolojik bozuklukta, serebral iskeminin asıl zarar veren aşaması reperfüzyon sürecidir ve tedavi yaklaşımlarının, reperfüzyon hasarını önlemeye odaklanması gerektiği düşünülmektedir (Shaik ve ark., 2021). Serebral iskemi tedavi stratejilerinin ilerlemesinde deneysel çalışmalar oldukça önemlidir. Deneysel patofizyolojik çalışmaların büyük çoğunluğu iskemik bölgenin yeniden kanlanması sonrası meydana gelen hasarı elimine etmek, hasta yaşamını stabilize edecek tedavi yöntemlerin araştırılması geliştirilmesi üzerine olmalıdır. Bu sebeple iskemi sonrası yeniden kanlanma ile meydana gelen hasarı ortadan kaldırarak, hastaların iyileşme sürecini hızlandıracak tedavilerin ilerletilmesi önemlidir.

Halk arasında inme olarak bilinen serebral iskemi, dünya genelinde en yaygın görülen nörolojik hastalıklardan biridir ve her yıl binlerce kişi bu nedenle hayatını kaybetmektedir. Ülkemizde ise her yıl 132.000 inme vakası rapor edilmektedir (Akçay, 2021). Gelişmiş ülkelerde tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler, inmenin neden olduğu ölüm oranlarında azalmaya katkı sağlamaktadır (Şahan ve ark., 2010). Söz konusu tedavi yöntemlerinin ve gerek hasta hayat kalitesinin iyileştirilebilmesi ve bunların yanında ileriki klinik çalışmaların önünü açmak adına yapmayı planladığımız proje önem taşımaktadır. Projemizin amacı bu derece hayati öneme sahip bir hastalığın ölüm oranlarını azaltmak, hasta hayat kalitesini arttırmak ve tedavi başarısını artırmaya yönelik çalışmalar yeni bilgiler ortaya çıkarmaktır. Bu bağlamda elde edilecek bilgilerin oldukça değerli olduğunu düşünmekteyiz.

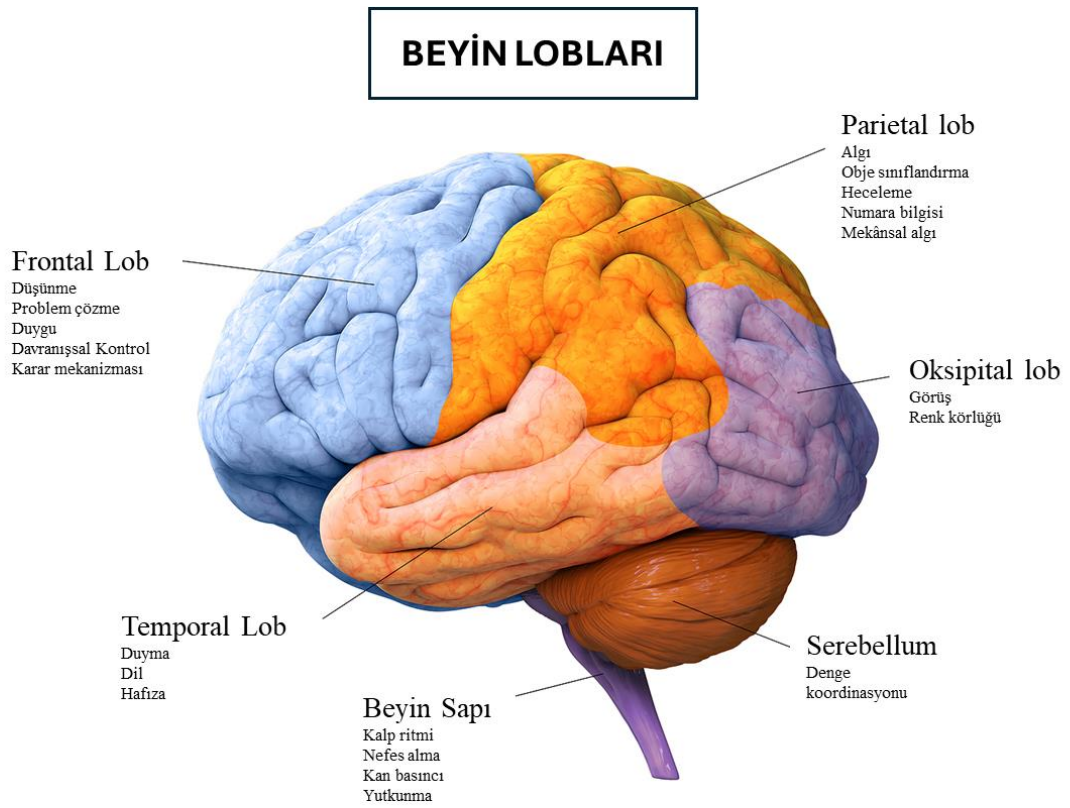
Phoenixin 14 (PNX-14), protein C4orf52'nin C-terminalinden ayrılan ve hipotalamik-hipofiz-gonadal üreme ekseninde yer aldığı bilinen Phoenixin peptiti başlangıçta üremedeki rolü için tanımlanmış olsa da PNX-14'ün çalışması, klinik fayda sağlayabilecek çeşitli diğer fizyolojik etkileri ortaya çıkarmıştır. Örneğin, araştırmalar, PNX-14'ün, in vitro iskemi-reperfüzyonu simüle etmek için kullanılan oksijen-glikoz yoksunluğu/reperfüzyon (OGD/R) hasarını inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak ve hücre canlılığını artırarak önleyebileceğini göstermiştir.

PNX-14 peptidinin beynin nöroprotektif mekanizmalarında anahtar bir bileşik olduğunu söylemek için henüz erken olsa da elde ettiğimiz çeşitli biyokimyasal, histolojik ve davranışsal bulgulara dayanarak, serebral iskemi modelinde olumlu sonuçlar aldığımızı ve bu alanda daha ileri araştırmalar için değerli bir temel sunduğumuzu düşünüyoruz. Amacımız, etkinliğini daha önce in vitro bir sistemde (B. Zhang ve Li, 2020a) gösteren PNX-14'ün, in-vivo sistemde (iskemi-reperfüzyon modeli sıçanlarda) histolojik biyokimyasal ve davranışsal olarak göstererek ileride gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalara ışık tutmak ve bu alanda yeni ilerlemelere katkı sunmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Beyin

Serebrum beyin sapı üzerinde yer alan hemisferler arası yarık ile simetrik iki hemisfere ayrılmaktadır. Beynin sol yarımküresi vücudun sağ yarısını, sağ yarımküresi ise vücudun sol yarısını kontrol etmektedir. Hemisferlerin yüzeyi sulkuslarla derin yarıklara ayrılmıştır. Serebral korteks frontal, parietal, oksipital, temporal insula gibi loplara ayrılmaktadır (Gartner ve Hiatt, 2007; Ross ve Pawlina, 2010) (Şekil 1).



Şekil 1. Serebral korteks beyin lobları (Gould, 2024).

Serebrumda, gri ve ak maddeden oluşan alanlar bulunmaktadır. Serebral korteks serebrum hemisferlerinin en dışında yer alan gri madde olarak da adlandırılan bölgedir. Neokorteks ise sadece memelilerde bulunan kıvrım sayısı en fazla tabakadır. Artan kıvrımlarla yüzey alanı artmakta ve daha çok nöron ile yüksek beyin fonksiyonları gerçekleşmektedir (Ross ve Pawlina, 2010).

Her biri benzersiz yapılara ve işlevlere sahip serebral korteks, hipokampus, serebellum, bazal ganglionlar, talamus ve hipotalamus gibi çeşitli bölgelerden oluşmaktadır. Duyusal uyarıyı, motor kontrolü ve bilişsel işlevleri işlemek için özel bölgelere sahip en dış katman olarak adlandırılan serebral korteks her biri birbirinden farklı nöron türleri ve düzenlemeleri içeren altı katmana sahiptir. Hafıza oluşumu, obje tanıma, mekânsal gezinme için anahtar bölge olarak kabul edilen hipokampus CA bölgeleri ve dentat girus dahil olmak üzere farklı hücresel dizilimlerin bulunduğu bir düzeni vardır. Hipokampus piramidal nöronlar açısından zengin bir bölge olup kafa travması, iskemik yaralanma gibi durumlara karşı özellikle hassas olduğu bildirilmiştir (Gould, 2024). Moleküler tabaka, Purkinje tabakası ve granüler tabakadan oluşan serebellum ise denge ve motor koordinasyonu kontrol etmektedir. Bu bölge aynı zamanda geniş dentritik ağ yapısına sahip büyük nöronlar olan Purkinje hücreleri ile de bilinmektedir. Bir diğer önemli bölge ise hareket düzenlenmesinde rol oynayan putamen kaudat nükleus gibi yapıları içeren GABAerjik nöronların bulunduğu bazal ganglionlardır. Hipotalamus endokrin ve otonomik işlevlerde görevli bölge olarak kabul edilmektedir. Talamus bölgesi ise duyu bilgilerin ilgili yerlere iletilmeden önceki işlendiği, yorumlandığı bölge bir nevi bilgi istasyonudur (Gartner ve Hiatt, 2007; Luiz Carlos Junqueira ve Carneiro, 2007).

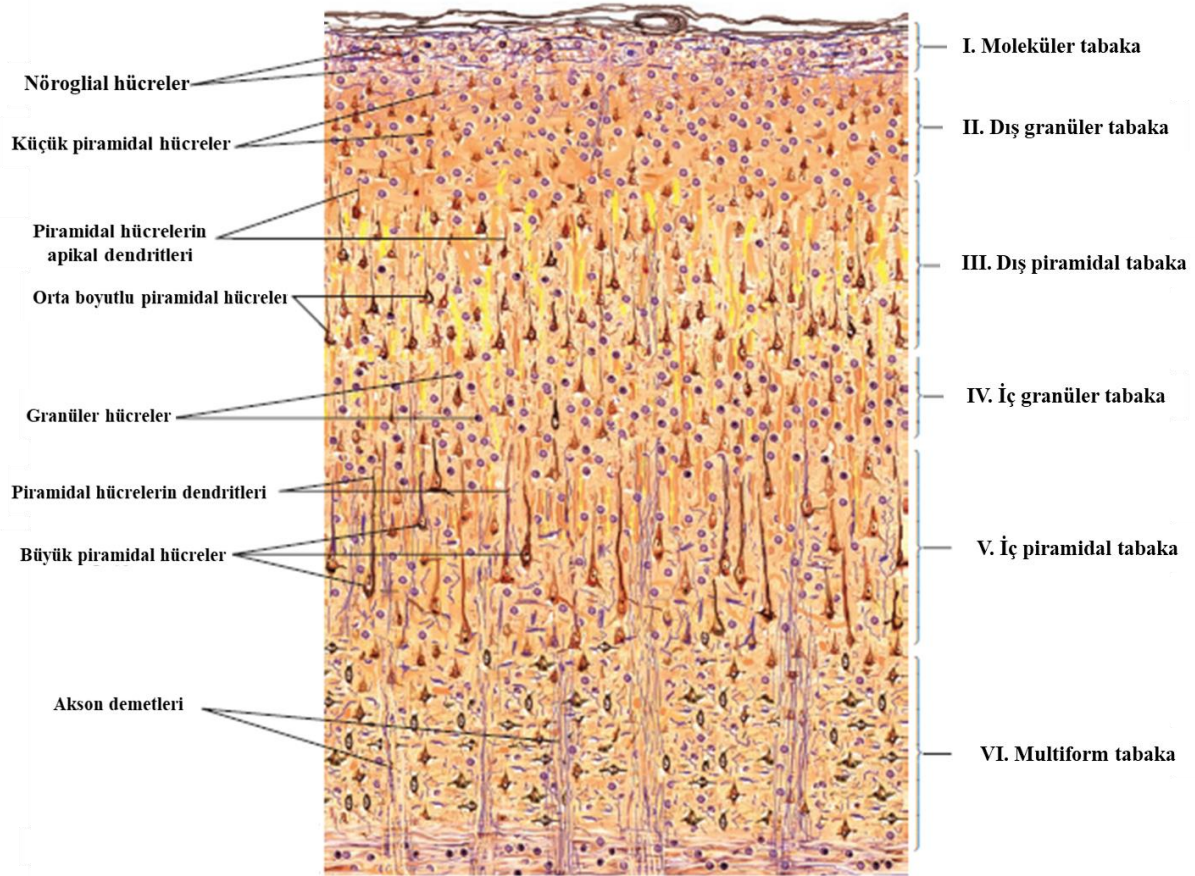
4.2.Serebral Korteks

Duyusal uyarıları, motor kontrolü ve daha yüksek bilişsel işlevleri işlemek için özel alanlara sahip en dış katmandır. Her biri farklı nöron türleri ve düzenlemeleri içeren altı katmana sahiptir. Piramidal hücreler ve granüler (stellat) hücreler olmak üzere iki ana nöron tipi bulunmakla birlikte serebral kortekste 60'tan fazla kortikal hücre tipi tanımlanmaktadır. Piramidal nöronlar, yıldız şekilli nöronlar, horizontal nöronlar, fuziform nöronlar ve Martinotti nöronları sıklıkla karşılaşılan nöron tipleri arasında gösterilebilmektedir (Gartner ve Hiatt, 2007).

İki ana nöron tipinden ilki uzun aksonları ve koni biçiminde hücre gövdesi bulunan serebral korteksin en büyük nöron tipi olan piramidal hücrelerdir. Motor fonksiyonlarda anahtar rol oynar çoğunlukla kortikal altı bölgelere projekte olurlar. Bu hücreler özellikle Dış ve İç Piramidal Tabakalarda bulunmaktadır. Granüler (stellat) hücreler piramidal hücreler göre histolojik olarak daha küçüktür, kısa aksonları vardır ve yıldız şekillidir. Genellikle yerel bağlantılarda görevlidirler ve duyu iletiminde anahtar rol oynamaktadırlar (Eroschenko ve Fiore, 2013; Kandel ve ark., 2012; Paxinos ve ark., 2006).

Serebral korteks, fonksiyonel olarak motor, duyuusal, görsel ve işitsel korteks olmak üzere 4 bölüme ayrılmaktadır (Eroschenko ve Fiore, 2013; Kandel ve ark., 2012; Standring ve ark., 2005).

Serebral korteks fonksiyonel ve hücresel özelliklerine göre farklılık gösteren 6 ana histolojik katmandan oluşmaktadır (şekil 2).



Şekil 2. Beyin korteksi, gri madde. Boya: Cajal yöntemi (Eroschenko ve Fiore, 2013).

Piramidal ve granüler (stellat) hücreler olmak üzere 2 ana hücre tipi bulunmaktadır. Az sayıda sinir hücresi içeren ve çoğunlukla horizontal akson ve dendrit yapısı bulunan duyu bilgisi alıcı yüzeyi olarak da değerlendirilen en üst tabaka olan *moleküler tabakadır*. *Dış granüler tabaka* olarak adlandırılan ve serebral korteksin diğer tabakalarından gelen sinyalleri alan bu tabaka yıldız şekilli granüler hücreler ve küçük piramidal hücreler içeren moleküler tabakanın bir alt tabakasıdır. Bir diğer tabaka dış granüler tabakanın altında bulunan uzun aksonlarıyla serebral korteksin diğer bölgeleriyle bağlantılar kuran orta büyüklükteki piramidal nöronları içeren *dış piramidal tabakadır*. Dış piramidal tabakanın altında duyu kortekste daha belirgin olarak

görülen *iç granüler tabakada* küçük granüler hücreler bulunmaktadır. Talamus gibi dış kaynaklardan gelen sinyalleri almaktadır. İç granüler tabakadan sonra büyük piramidal hücrelerden oluşan *iç piramidal tabaka* bulunmaktadır. Bu tabakada Betz hücreleri olarak adlandırılan omuriliğe kadar uzanan uzun aksonlarla motor fonksiyonların kontrolünde önemli rol oynayan dev piramidal hücreler bulunmaktadır. Son olarak kortikal altı bölgelerle iletişimi sağlayan talamus ile yoğun bağlantılara sahip farklı şekillerde nöronlar bulunan *Multiform tabaka* bulunmaktadır (Paxinos ve ark., 2006; Standring ve ark., 2005; Zilles ve Amunts, 2010).

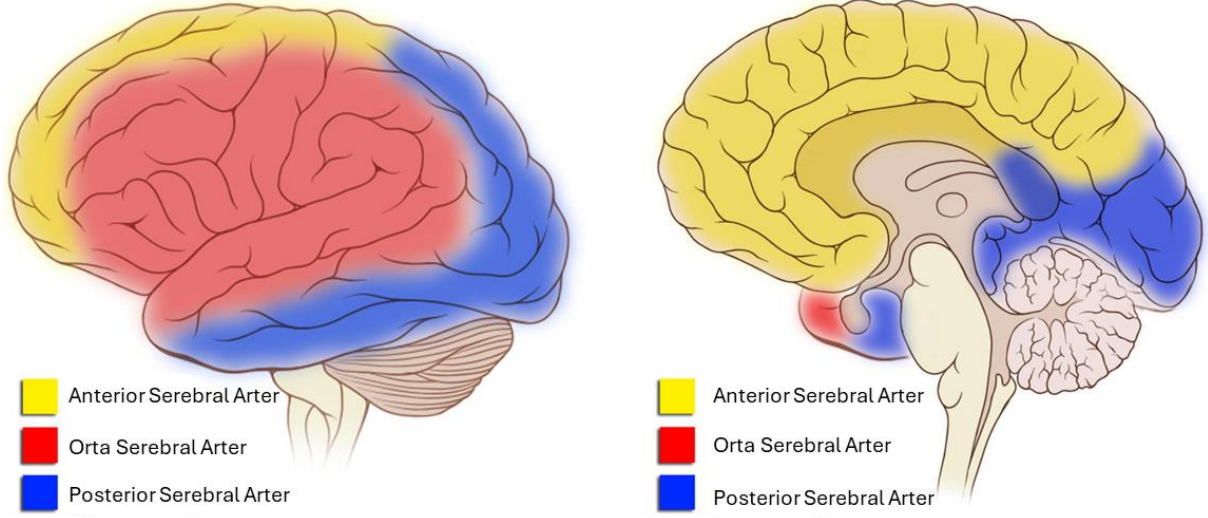
Nöronlara ek olarak, korteks astrositler, oligodendroglial hücreler, mikrogliyal hücreler ve endopodial hücreler olmak üzere destekleyici nöroglial hücreler içermektedir (Ross ve Pawlina, 2010).

4.3.Serebrum Kanlanması

Beyin, ortalama 1350 gram ağırlığında olup yeterli oksijen ve enerji tüketimi ile algılama ve bedensel hareketler gibi fizyolojik işlevleri yerine getiren bir organdır. Beyni oluşturan sinir hücreleri ve yardımcı (glia) hücreleri, membran potansiyelini sürdürmek, hasar gören yapılarını yenilemek, aksoplazma oluşturmak, nörotransmitter üretmek ve depolamak durumundadır. Bu sebeple sistemdeki diğer başka organlara göre daha çok oksijen ve enerji gereksinimi hissetmektedir (Şahan ve ark., 2010).

Kalpden pompalan kanın ortalama %20'si serebrum tarafından kullanılmaktadır (Kaya ve Özdemir 2011). Serebral dolaşım, kanın beyni besleyen serebral arterler ve damarlar ağı boyunca dolaşmasıyla gerçekleşmektedir. Basit şekilde, oksijen yönünde zengin kan, glikoz ve diğer besin maddeleri arterlerle beyne iletilirken karbondioksit, laktik asit ve diğer metabolik ürünlerce zengin kan venler ile serebrumdan uzaklaştırılır. Fizyolojik koşullarda beynin kanlanması dakikada 45-55 ml/100g olmasına karşın gri maddede metabolizma hızı ve kanlanma beyaz maddeden 4 kat daha fazla olmaktadır. Tüketilen enerjinin ortalama %40'ı hücresel iç denge için kullanılırken, geriye kalan kısım ise sinaptik iletişimde kullanılmaktadır (Oğul, 2002). Beynin vücuttaki oksijenin yüzde 20'sini ve glikozun da yüzde 25'ini tükettiği bilinmektedir (Kaya ve Özdemir 2011). Beyindeki sinir hücrelerinin de asıl enerji kaynağı Adenozin 3-trifosfattır (ATP). Buradaki sinir hücreleri glikojen depolayamadıklarından her zaman glikoza gereksinim duymaktadır (Oğul, 2002). Glikozun ise %80'i enerji üretimi için tüketilirken, %20'sini nörotransmitter, protein ve lipid sentezi için kullanılmaktadır (Şahan ve ark., 2010).

Kortikal Vasküler Alanlar



Şekil 3. Kortikal vasküler alanlar (Cruces ve ark., 2022'den esinlenilerek hazırlanmıştır).

Beyne gelen oksijen zengin kanın dolaşımını arkus aortadan köken alan 4 ana damar gerçekleştirmektedir. Bunlar, ön beyin bölgesinde sağ ve sol internal karotiden, arka beyin bölgesinde ise sağ ve sol vertebral arterlerdir. Beynin kanlanması anterior serebral arter, orta serebral arter ve posterior serebral arter olmak üzere üç arter vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Serebellumun kan dolaşımını ise posterior inferior serebellar arter, süperior serebellar arter ve anterior inferior serebellar arterler vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Balkan, 2009; Oğul, 2002).

Dolaşımdaki herhangi bir kesinti beyinde hızlı bir şekilde hasara neden olacağından, beyindeki dolaşım sistemi, kan damarlarının otoregülasyonunu da içeren güvenlik önlemlerine sahiptir (Balkan, 2009). Bu önlem mekanizmalarında herhangi bir problem gerçekleşmesi felçle sonuçlanabilmektedir.

Mitokondride hipoksi ya da iskemi durumu sonrası oksijenli solunum durarak, oksijensiz solunum devam ettiğinden hücredeki birincil tepki oksijensiz glikolizdir. Hasar bölgesinde azalan ATP seviyesi kaynaklı Adenozin monofosfat konsantrasyonu artmaktadır. Bu durumda fosfofruktokinaz (PFK) enzim aktivitesiyle, ATP üretimi için oksijensiz glikoliz başlamaktadır (Berg ve ark., 2002). Hücrede oksijen basıncı (PaO_2), 0,1 mmHg'nin altına indiğinde oksijenli solunumun durmasıyla oksijensiz glikoliz başlar ve hücrede çok daha düşük ATP üretilir (Sims, 2010). Bu şekilde nöronlar için gerekli enerji karşılanamamaktadır (Akçay, 2021).

4.4. İnme

İnme bir diğer adıyla felç, iskemik inme ve hemorajik inme olmak üzere iki ana türde meydana gelebilen beyin kan akışının kesilmesiyle oluşan bir durumdur. Detaylı fizik muayene ile manyetik rezonans, bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme sistemleri kullanılarak teşhis edilebilmektedir (Coleman ve ark., 2017).

İskemik inme beyin kanlanmasının bir pıhtı veya damar daralması sebebiyle engellenmesi ile ortaya çıkmaktadır. Hipertansiyon, yüksek kolesterol, obezite, diyabet gibi sağlık sorunu olan bireylerde görülme sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Klinikte tedavi yöntemi olarak trombolitik tedavi ya da mekanik trombektomi kullanılmaktadır (Coleman ve ark., 2017; Kuklina ve ark., 2012).

Hemorajik inme beyin kan damarlarının parçalanması sebebiyle yüksek intrakraniyal basınçla kanın beyin dokusu içine sızması durumu olarak tanımlanmıştır. Daha çok kafa travmalarında görülse de yüksek tansiyon problemi olan bireylerde de görülme sıklığı yüksektir. Beyinde artan kan basıncı cerrahi yöntemler kullanılarak azaltılmaktadır (Vitt ve ark., 2019).

İnme, genel olarak ani güçsüzlük, yüz veya kolların bir tarafında uyuşma, görme problemleri, konuşma bozuklukları denge ve koordinasyon kaybı gibi belirtiler ile kendini göstermektedir. İnme geçiren bireylerde ikinci bir inme riski yüksek olarak görülmektedir. Bu nedenle yaşam tarzı değişiklikleri, düzenli tıbbi kontroller ve ilaç kullanımı önemli olmakla birlikte konuşma terapisi, mesleki terapi, fiziksel terapi de önerilmektedir (Coleman ve ark., 2017).

4.5. İskemi-Reperfüzyon

Vücuttaki herhangi bir organın kanlanmasının tamamen kesilmesi ya da yetersiz hale gelmesiyle hücrelerde gerekli enerji oksijen yoluyla elde edilememektedir. Bu durumda devreye anaerobik metabolizma girmekte ve iskemi durumu oluşmaktadır. İnme (felç) gibi ciddi sorunlara yol açabilen serebral iskemi, kalp krizi ya da göğüs ağrısına neden olabilen miyokardiyal iskemi, bağırsak işlevini bozup ciddi karın ağrısına sebep olabilen bağırsak iskemisi, uzuv ağrıları ile kendini gösterebilen uzuv iskemisi gibi türlü iskemi çeşitleri bulunmaktadır.

İskemi durumlarında doku perfüzyonu sağlanamadığından oluşan atık ve toksik metabolitler dokuda aşırı birikerek normal fonksiyonun giderek kaybedilmesine sebep olmaktadır.

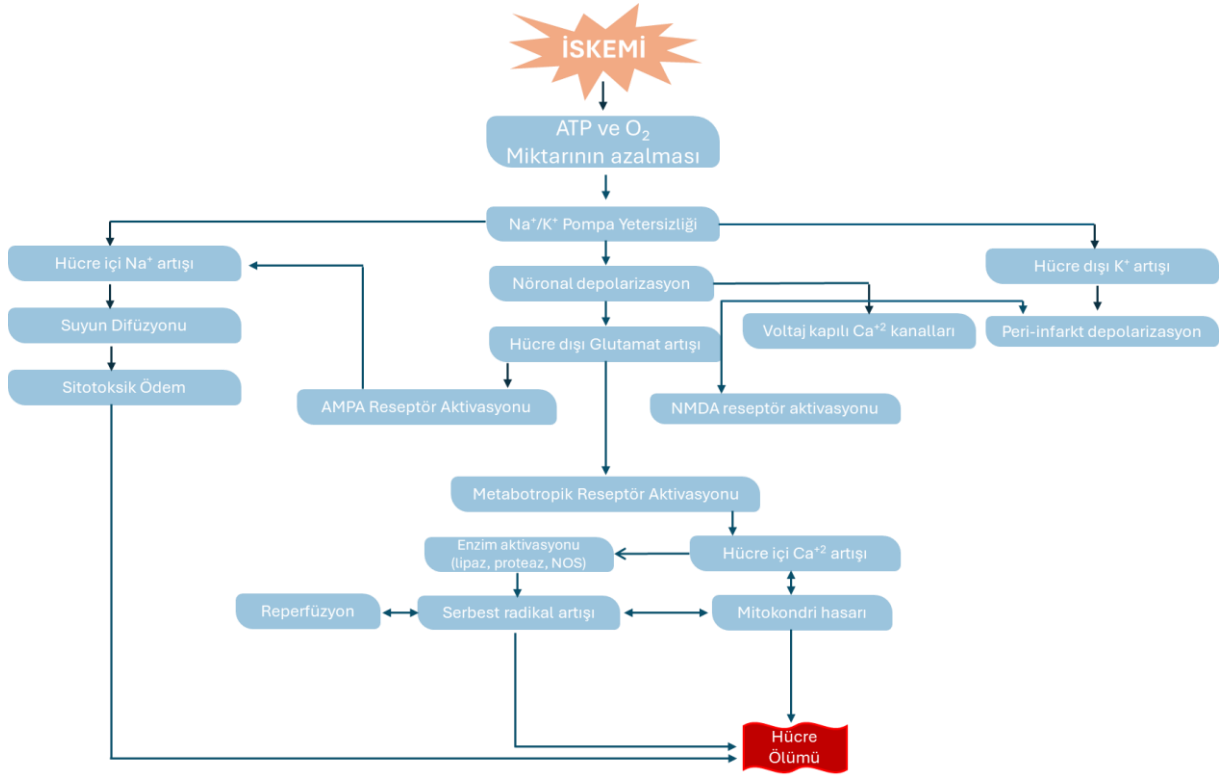
Hücrelerdeki bu kaybın neden olduğu tahribatın seviyesi ise meydana gelen iskeminin düzeyi ve süresiyle belirlenir. Bu sürenin uzun sürmesi geri dönüşü olmayan tahribata yol açabilmekte ve süreç hücrel ölümüne gidebilmektedir. Damar içi plak, pıhtı oluşumu ya da ani kasılma ve daralmalar sebebiyle kan akımında kesinti oluşabilir. Kesinti durumunda tetiklenen çeşitli ardışık kimyasal olaylar hücrel yapı ve fonksiyonların görevini yerine getirememesine sebep olmaktadır. Bu birbirini takip eden kimyasal olaylar “iskemik kaskad” olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4). (de Groot ve Rauven, 2007; Gupta ve ark., 2004; Mohr ve ark., 2011).

Bu süreç, kan akışının yetersizliği nedeniyle beyin dokusunda oksijen ve glikoz eksikliği ile başlar ve hücrel hasarı artıran olaylar zincirini tetikler.



Şekil 4. İskemik kaskad aşamaları.

İskemik kaskad, beyin hasarını artırdığı için araştırmacılar tarafından bu sürecin farklı aşamalarında müdahale edebilecek tedavi yöntemleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça önem taşımaktadır.



Şekil 5. İskemi hasarının oluşum süreçleri.

Vücut dokularının normal işlevlerini yerine getirebilmeleri için yeterli miktarda oksijen sağlanamaması hipoksi olarak adlandırılır. Hipoksi durumunda, hücresel metabolizma bozulur ve bu durumda hücre programlanmış ya da travmatik hücre ölüm sürecine girer. Enerji metabolizmasının çökmesi, mitokondriyal disfonksiyon, ROT, oksidatif stres, asidoz, apoptoz ve nekroz hücreyi ölüm sürecine götüren bazı olaylar arasında gösterilebilir (de Groot ve Rauen, 2007; Hurn ve ark., 2002; Toklu ve ark., 2009).

Çoğunlukla arter tıkanıklığı nedeniyle dokuya gelen kan akımının yetersiz kalmasına sebep olan durumun ortadan kalkarak, kan akışının yeniden sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Süreç iskemik dokuyu kurtarmayı amaçlamakta ve hücresel disfonksiyonların düzeltilmesi için gereklidir ve iskemik dokuyu kurtarmayı amaçlayan tıbbi tedavi süreçlerinde oldukça önemli olmaktadır. Fakat, tehlikeli sonuçlar da doğurabilmektedir (de Groot ve Rauen, 2007; Kalogeris, Baines, ve Krenz, 2012).

İskemik dokuya kan akışının tekrar sağlanması, şekil 5’te gösterildiği gibi yükselen oksijen ile serbest radikal türevlerinin üretimini artmasına neden olmakta ve bu durum, inflamatuvar araçlar gibi çeşitli mekanizmalarda bir dizi değişikliğe yol açarak bölgesel doku hasarını artırır.

Bu sebeple oluşan hasarın büyük bir kısmı reperfüzyon aşamasında meydana gelmektedir ek olarak oluşan zehirli metabolitlerin genel dolaşıma girmesi ise sistemik hasarın yayılmasına neden olabilmektedir (Christophe ve Nicolas, 2006; de Groot ve Rauen, 2007).

Reperfüzyon hasarı, hücre içinde ve dışında meydana gelen çeşitli mekanizmaları içeren çok yönlü bir süreçtir (Verzár ve ark., 2011). İskemi sırasında tetiklenmiş Na^+/H^- taşıma sistemi reperfüzyon boyunca intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu yükseltirken iç mitokondriyal membrandaki mitokondriyal geçirgenlik artmaktadır. Bu artış mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin açılmasıyla meydana gelmektedir. Geçirgenlikteki bu artış hücre hasarı ve ölümüne katkıda bulunmaktadır (Pantazi ve ark., 2016).

İskemi sürecini (şekil 5) takiben reperfüzyon ile dokuya kan akışı başlamaktadır. Reperfüzyona bağlı olarak iskemik alandaki dokuda O_2 miktarının artışıyla ödem oluşumu, ROT artışı ve nötrofil göçü gibi metabolik reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar iskemik dokudaki hasarın artmasına neden olmaktadır (Swanson ve ark., 2004). İskemik doku hasarının meydana gelmesinde reperfüze dokularda biriken nötrofillerin anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlamasında ROT ve lipit peroksitler önemli bir rol oynamaktadır.

Nötrofiller salgıladıkları proteazlar ve elastazlar gibi enzimler ile endotel hücrelerini parçalayarak agregatlar oluştururlar. Oluşan agregatlar kılcal damarlardaki kan akımını engellerler veya salgılanan vazokonstriktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktörler sayesinde büyük damarlarda da daralmalar meydana gelmesine sebep olurlar. Nötrofil kaynaklı bu iki durumun reperfüzyonda doku hasarının artmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Huang ve ark., 2006; Iadecola ve Alexander, 2001).

4.5.1. Serebral İskemi

Beyin iskemisi, glikoz ve oksijen yoksunluğundan kaynaklanan bir metabolik stres biçimidir. Sıklıkla bir damarın tıkanmasıyla beynin bir bölümüne giden kan akışının aniden kesilmesiyle oluşur. Halk arasında bilinen ismiyle inme, sanayileşmiş ülkelerde koroner kalp hastalığı ve kanserin ardından üçüncü en yaygın ölüm sebebi olup, aynı zamanda ciddi sakatlığa yol açabilen en önemli etkenlerden biridir (Cimarosti ve Henley, 2008).

İskeminin, hücresel enerji kaybı sonucunda meydana geldiği ve hücre dışı ortamda glutamat birikimi, eksitotoksisite, kalsiyum dengesizliği, mitokondriyal işlev bozukluğu ve oksidatif

stres gibi bir dizi patolojik mekanizmayı tetiklediği bilinmektedir. Aynı zamanda iskemi, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi translasyon sonrası protein modifikasyonlarını aktive etmektedir. İskemiye bağlı posttranslasyonel protein modifikasyonlarındaki bu farklılıkların, iskemik nöronal hücre ölümünde rol oynayan patolojik süreçte kritik bir etkisi olduğuna inanılmaktadır (Althausen ve ark., 2001).

4.5.2. Serebral İskemi patofizyolojisi

Merkezi sinir sistemi serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı en savunmasız sitemlerden biridir. Beyin ise bu sistemde yüksek metabolik hızı ve yüksek oksijen ihtiyacı olan bir organdır. Ek olarak kolayca okside olabilme yeteneğine sahip zengin yağ asitlerinin bulunması ROT oluşumunu arttırmaktadır. Bu sebeplerle beyin iskemiye olan dayanıklılığı oldukça az bir organ olarak bilinmektedir (Kalogeris, Baines, Krenz, ve ark., 2012; Özgül ve Nazıroğlu, 2011).

Serebral iskemi sırasında, iskemik alanda eksitotoksisite, inflamasyon infarkt çevresi depolarizasyon ve hücre ölümü olarak adlandırılan dört ana metabolik süreç mevcuttur. İskemi sırasında hasar süreci, O₂'ye bağımlı hücrelerin (nöronlar, glial hücreler) anoksik hasarı asıl hasar süreci olarak görülmektedir. Bu hasar oksidatif fosforilasyon, ATP sentezi gibi mitokondri kaynaklı enerji üretiminin azalmasıyla hücre içerisindeki enerji düşüşüyle başlamaktadır (de Groot ve Rauen, 2007; Mohr ve ark., 2011).

İskemik süreçte, enerji eksikliğinden kaynaklı (direkt ya da indirekt), hücresel iyon dengesinin bozulması, hidrolazların aktif hale gelmesi ve hücre zarı geçirgenliğinin artması gibi çeşitli hücre içi değişiklikler yaşanmaktadır.

Hücresel enerjiye bağımlı iyon pompaları aktivite kaybı kaynaklı hücre zarı depolarizasyonu tetiklenmektedir. Zar yapısında meydana gelen bozulma, iyon yoğunluk dengesinin değişmesine ve hücre içine Ca⁺² girişine yol açarak intraselüler birikime neden olmaktadır. İyon dengesindeki bu bozulma ise glutamatın serbest bırakılmasına sebep olmaktadır. Memeli beyinde, glutamat hem temel uyarıcı hem de hücreler arası iletişimde kritik bir nörotransmitterdir (Szijártó ve ark., 2013). Normal koşullarda hücre içindeki glutamat seviyesi, hücreler arası seviyeden daha yüksek olmaktadır. İskemi sırasında nöronal zarların depolarize olması, hücreler arası glutamat konsantrasyonunun artmasına neden olur. Glutamat artışı, N-metil D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA aktivasyonunu tetiklemektedir.

NMDA reseptör aktivasyonu hücrede eksitotoksisteden sorumludur. İskemik alanda, membran NMDA reseptörlerinin bozulması ile nöronlar içine Na^+ , Cl^- 'un girişi gerçekleşmektedir. Membran reseptörlerindeki bu bozulma ile hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} dengesi bozulmaktadır. Özellikle fosfolipaz A_2 olmak üzere hücre içi fosfolipazların artışı hücre içi Ca^{+2} artışından kaynaklıdır ve bu artış ile hücre içi hidrolazların (özellikle kalpainler) da miktarında artış meydana gelmektedir. Hidrolazlar kaynaklı artan substrat parçaları hücre içi Na^+ miktarını arttırarak hücreyi ozmotik olarak şişirir ve bu durum hücre yaralanma sürecini daha da arttırmış olmaktadır (de Groot ve Rauen, 2007; Mohr ve ark., 2011).

NMDA reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonu, nöron içine Ca^{+2} girişini arttırarak, Ca^{+2} 'ye bağımlı proteaz ve lipaz gibi enzimlerin etkinleşmesine yol açar. Bu süreç, beyinde doku hasarını başlatır ve gecikmiş hücre ölümüne sebep olur (Allen ve Bayraktutan, 2009; Kalogeris, Baines, ve Krenz, 2012; Stoodley ve ark., 1998).

Beyin iskemisi sırasında iskemik doku ve çevre dokuda, başta lökositler, interlökinler olmak üzere adezyon molekülleri sitokinler ve kemokinler gibi bir dizi inflamatuvar araçlarda artma meydana gelmektedir. İnflamatuvar tepkimeler, iskemik hasarın ileriki aşamalarına katkıda bulunmakta ve olası nörolojik bulguların kötüleşmesine yol açmaktadır (Huang ve ark., 2006; Iadecola ve Alexander, 2001; Kalogeris, Baines, ve Krenz, 2012).

İskemiye takip eden reperfüzyon dönemi, beyinde ciddi hasarların olduğu bir aşamadır ve bu aşamadan önce uygulanacak tedavilerin, beyin hasarını önlemek veya en aza indirmek için faydalı olabileceği düşünülmektedir (Bonaventura ve ark., 2016).

4.5.3. Serebral İskemi Modelleri

İnme/İskemik felç gibi hastalıkları ve altında yatan mekanizmaları incelemek, aynı zamanda olası tedavi stratejilerini belirlemek için in vivo ve in vitro olmak üzere çeşitli hayvan modelleri belirlenmiştir (Cimarosti ve Henley, 2008). Beyin iskemisinin klinikteki farklı formlarını modellemek için korteks yapısının insan beyni korteks yapısına benzerliğinden, sıçanlar, fareler, çöl fareleri ve domuzlar gibi farklı hayvanlar kullanılmakta ve beyin iskemisi için en uygun hayvan modelleri olarak düşünülmektedir (Traystman, 2003a).

Kullanılan hayvan modelleri, ön beyin serebral iskemisi, fokal serebral iskemisi ve globalserebral iskemisi olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır (Gupta ve ark., 2004). İn vivo modeller arasında

da iskemik benzeri" oksijen-glikoz yoksunluğu (OGD) modeli sıklıkla kullanılmaktadır (Dawson ve ark., 1996; Goldberg ve Choi, 1993; Hossmann, 2008).

Bu tür hayvan modelleri akut veya yavaş, odaksal (fokal) veya küresel (global), kalıcı veya geçici olmak üzere beyne giden kan akışının farklı şekillerde kesilmesine olanak sağlamaktadır. Bu modeller iskemiye bağlı nöronal hasarın, patofizyolojik süreçlerin ve olası tedavi yöntemlerinin araştırılmasında kullanılır (Hossmann, 2008).

Akut etkilerin incelenebileceği ve uzun vadeli davranışsal çalışmalara olanak tanıyan bir prosedür olan endotelin-1 infüzyonu da kullanılan yöntemler arasındadır (Callaway ve ark., 2000; Cimarosti ve Henley, 2008). Örneğin bir başka çalışmada perinatal hipoksi-iskeminin etkilerini araştırmak amacıyla, doğumdan sonraki 7. günde sıçanlara sistemik hipoksi (%8 oksijen) uygulanmış ardından tek taraflı common karotis arterin bağlanması, çocukluk çağı felcinin patofizyolojisini anlamada etkili bir model olabileceği bildirilmiştir (Cimarosti ve Henley, 2008; Vannucci ve Vannucci, 2005).

4.5.3.1.Global serebral iskemi modeli

Global beyin iskemisi süreci beyine giden kan akışının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu meydana gelen yaygın ve ciddi bir nörolojik durumdur. Bu durum, genellikle kalp durması, şiddetli hipotansiyon veya boğulma gibi olaylar sonrasında ortaya çıkmaktadır (Mohr ve ark., 2011).

Global serebral iskemi, kalp durması veya beyin kan dolaşımının belirli bir süreliğine kesilmesi yoluyla oluşturulabilir. Sıçan modellerinde, tam ya da neredeyse tam global beyin iskemisi oluşturmanın en bilinen yöntemi, her iki vertebral arterin pıhtılaştırılması ve bunu takiben bir gün sonra her iki ana karotid arterin geçici olarak tıkanmasıdır (Pulsinelli ve Brierley, 1979). Bu model serebral iskeminin patofizyolojisini ve tedavi stratejilerini aydınlatmak için anahtar bir yol olarak düşünülmektedir. Bu modelde dört damar oklüzyonu (her iki karotid arter ve vertebral arterler), 2 damar oklüzyonu (2 karotid arter), tek damar oklüzyonu (tek karotid arter) ve kalp durması, hipotansiyon gibi farklı iskemik oluşumlar bulunmaktadır (Traystman, 2003b).

Global iskemi modelleri, kalp durması veya genel hipotansiyon gibi tüm beyin perfüzyonunu etkileyen klinik durumları ve tüm beyni etkileyen gerçek hayattaki olayları anlamada daha

yakın sonuçlar sağladığından araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (Hurn ve ark., 2002; Traystman, 2003b).

Global iskemi hayvan modelleri, serebral iskemiyeye bağılı genel beyin hasarını, nöroprotektif tedavi yöntemlerini ve beynin bilişsel ve davranışsal etkilerini incelemek için çok yönlü bir araçtır. Beynin hipokampus, korteks ve bazal ganglionlar gibi birden fazla bölgesinde hasar oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Hipokampus gibi öğrenme ve hafıza süreçleriyle ilgili beyin bölgelerinde belirgin hasara yol açtığı için, bilişsel fonksiyonların etkilenmesini inceleyen çalışmalar için de tercih edilen bir model olmaktadır. Örneğin fokal iskemi modellerinde (örneğin, orta serebral arter oklüzyon modeli) tek bir bölgede hasar oluşturma imkanı varken global serebral iskemi modelinde insan inme sürecini modelleme ve üzerinde çalışma olanağı daha fazladır. Diğer serebral iskemi modellerine kıyasla, beyindeki yaygın etkiler ve çoklu beyin bölgelerini içeren çalışmalar için araştırmacıların daha çok ilgisini çekmektedir (Traystman, 2003b).

4.6.Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, metabolik faaliyetler sırasında ya da çevresel faktörlerle (örneğin UV ışınları, sigara dumanı) ortaya çıkan dengesiz moleküllerdir. Bu moleküller, elektron eksikliklerinden dolayı diğer moleküllerle reaksiyona girerek hücre zarları, proteinler ve DNA gibi hayati biyomoleküllere zarar verebilir. Bu durumda, hücresel yaşlanma ve mutasyonlar meydana gelerek kanser gibi hastalıklara yol açabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Oksidatif stres ise, serbest radikaller adı verilen reaktif moleküllerin, DNA, protein ve lipit gibi önemli biyomoleküllerde hasara yol açarak vücuttaki hücrelere zarar vermesiyle oluşur. Genellikle yaşlanma süreci ve kanser, kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklarla ilişkilendirilebilir. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek bu hastalıkların oluşumunu geciktirmede kritik bir göreve sahiptir. Bununla birlikte, düzenli olarak antioksidan tüketimi vücudun savunma mekanizmasını güçlendirerek genel sağlığın iyileşmesine destek olur (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Lobo ve ark., 2010).

Oksidatif stresi önlemeye veya azaltmaya yardımcı antioksidanlar vücutta serbest radikalleri nötralize ederek onları zararsız hale getirmektedir. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen olmak üzere 2 bölüme ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlar vücutta üretilirken, eksojen

antioksidanlar beta-karoten, E vitamini, C vitamini ve selenyum gibi dışarıdan besin yoluyla alınmaktadır.

Antioksidanlar, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerleyişini yavaşlatma potansiyeline sahiptir. Beyin, yüksek oksijen tüketimi nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Çalışmalar, flavonoid ve polifenol bakımından zengin besinlerin beyin hücrelerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabileceğini göstermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Antioksidan moleküller arasında enzimatik antioksidanlar özellikle dikkat çekmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerini (O_2^-) zararı daha az olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürerek hücrelerdeki oksidatif stresi azaltan kritik bir enzimdir. Katalaz ise, H_2O_2 'yi oksijen (O_2) ve suya (H_2O) parçalayarak hücre için zararlı hale getirmiş olur. Ayrıca, Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve organik peroksitleri su ve alkol bileşenlerine dönüştürerek bu zararlı maddelerin etkisini azaltır. Bu enzim, glutasyon adı verilen önemli bir antioksidanı kullanarak işlev görür ve hücrelerdeki redoks dengesini korumaya yardımcı olur. Bu enzimatik antioksidanlar, hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında kritik bir rol oynar ve genel sağlık durumunu iyileştiren beslenme yaklaşımlarının bir parçası olarak dikkat çeker (Finkel, 2000; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Oksidatif stresten korumada önemli etkileri olan bir diğer antioksidan mekanizma ise moleküler mekanizmadır. Bunlar arasında hem hücre dışı hem de hücre içinde ROT ile savaşan ve suda çözünebilir Vitamin C (askorbik asit), hücre zarındaki lipidlerin oksidasyonunu engelleyerek hem hücre zarını hem de lipoproteinleri koruyan Vitamin E (tokoferol), vücuttaki en güçlü antioksidanlardan biri olarak görülen, serbest radikalleri nötralize eden ve oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizması sağlayan Glutasyon ve ayrıca bitkilerden elde edilen karotenoidler vardır (Finkel, 2000; Sies, 2017).

Ayrıca glutasyon sistemi ve Nrf2 (Nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) gibi hücre içi antioksidan sistemler de bulunmaktadır. Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri birlikte çalışarak hücre içi oksidatif hasarı minimumda tutmayı sağlarken Nrf2 ise oksidatif strese karşı gen ekspresyonunu düzenler.

Mitokondriler hücrede en fazla serbest radikal üreten organeller olduğundan SOD'nin mitokondriyal formu (SOD2) ve glutatyon sistemi, mitokondrileri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumaktadır (Finkel, 2000).

4.7.Nöropeptitler

Nöronlar ve glial hücreler tarafından sentezlenen 2-40 amino asit uzunluğunda küçük protein benzeri, çeşitli önemli fizyolojik özellikleri bildirilen moleküller nöropeptit olarak adlandırılmaktadır (Cleveland, 2018; Gundlach ve Hargreaves, 2011; Hökfelt ve ark., 2000). Farklı moleküller ve fizyolojik koşullarda hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanabilirler, kan dolaşımına ya da sinaptik boşluğa salgılanırlar. Bu etkilerin yanında, duygusal durum, ağrı algısı, yemek yeme davranışı stres tepkisi, uyku düzeni, öğrenme gibi durumda anahtar rol oynarlar (Hökfelt ve ark., 2000).

Nöropeptitler, pek çok hastalığın tedavisinde hedef moleküller olarak incelenmektedir. Örneğin, migren tedavisinde CGRP inhibitörleri, depresyon tedavisinde serotonin ve diğer nöropeptit sistemlerinin düzenlenmesi üzerine araştırmalar yürütülmektedir. Bunun yanı sıra, nöropeptitlerin rolü, nörodejeneratif hastalıklarda, sindirim sistemi bozukluklarında ve obezite gibi metabolik hastalıklarda da incelenmektedir (Cleveland, 2018). En bilinen nöropeptit çeşitleri sinir sistemi üzerindeki etkileriyle öne çıkan ve çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen opioid peptitler, substance P, vazopressin ve oksitosin, nöropeptit Y, somatostatin ve Phoenixin olarak sıralanabilir (Sharma ve ark., 2022).

4.7.1. Phoenixin-14

Phoenixin-14 (PNX-14), protein C4orf52'nin C-terminalinden ayrılan ve hipotalamik-hipofiz-gonadal üreme ekseninde yer aldığı bilinen Phoenixin peptit ailesinin bir üyesidir (McIlwraith ve ark., 2019; Yuan ve ark., 2017). Başlangıçta üremedeki rolü için tanımlanmış olsa da PNX-14'ün çalışılması, klinik fayda sağlayabilecek çeşitli diğer fizyolojik etkileri de ortaya çıkarmıştır. Hipotalamusta yüksek oranda bulunan irPNX-14 timüs, mide ve dalak dahil olmak üzere periferik dokularda daha düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir (Schalla ve Stengel, 2018). PNX-14'ün etkilerine dair yapılan çalışmalar, bu peptitin sinir sistemi, motor fonksiyon, metabolik denge ve duyuşal fonksiyonlar üzerinde belirgin roller oynayabileceğini göstermektedir. Örneğin, araştırmalar, PNX-14'ün, in vitro iskemi-reperfüzyonu simüle etmek için kullanılan OGD/R hasarını inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak, hücre canlılığını

artırarak önleyebileceğini göstermiştir. Daha spesifik olarak, PNX-14, nitrik oksit ve endotelial nitrik oksit sentaz koruyucu faktörlerin ekspresyonunu desteklerken ROT ve NADPH oksidaz 1 (NOX1) üretimini azalttığı görülmüştür (B. Zhang ve Li, 2020a). Ek olarak, PNX-14, iskemik beyin hasarında inflamatuvar yanıtın başlatılmasında çok önemli bir rol oynayan yüksek mobilite grubu kutu 1 (HMGB1) proteininin ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Hongling ve ark., 2020).

PNX-14'ün, inflamatuvar yanıtları düzenleyerek pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β gibi) seviyelerini düşürebileceği ve nöral inflamasyonu azaltma potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir. Anti-inflamatuvar etkisinin yanında anti-apoptotik yolları aktive ederek hücre sağkalımında önemli bir role sahiptir ve PNX-14'ün bu yolu aktive ederek nöronal hayatta kalmayı artırabileceği düşünülmektedir (Ling ve ark., 2021a).

PNX-14, hücrelerdeki antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ederek oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunabileceği düşünülmekte ve intraserebroventriküler (icv) olarak uygulandığında besin alımını arttırıldığı bildirilmiştir (Schalla ve ark., 2017a).

Sinir sistemi üzerindeki etkilerinde, PNX-14'ün birçok nörotransmitterin salınımını düzenlediği ve bu yolla nörolojik süreçleri modüle ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımını artırarak üreme döngüsünde önemli bir role sahip olduğu ve hipotalamus aracılığıyla üreme hormonlarının salınımını etkilediği görülmüştür (Kulinska ve ark., 2021). Davranışsal etkiler bakımından, PNX-14'ün anksiyete ve stres yanıtı üzerinde etkili olabileceği, bazı çalışmalarda bu peptidin anksiyete benzeri davranışları azalttığına dair kanıtlar olduğu bildirilmiştir (Schalla ve ark., 2017a). Bu etkinin, beyindeki belirli sinir yolları aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Metabolik etkiler alanında, PNX-14'ün enerji homeostazı ve besin alımını düzenleyebileceği, obezite ve metabolik bozukluklarla ilişkili etkilerinin araştırıldığı ifade edilmektedir. Duyusal işlevler açısından ise PNX-14'ün duyu algıyı modüle etme potansiyeline sahip olduğu, özellikle acı ve tat duyularıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Fizyolojik etkileri genel olarak üreme, immün yanıt ve beyin işlevlerini kapsamaktadır. Üreme sistemi üzerindeki etkileri hem erkeklerde hem de kadınlarda cinsel gelişim ve döngülerin düzenlenmesine katkı sağlar. İmmün yanıt açısından ise PNX-14'ün inflamasyon ve bağışıklık yanıtlarını modüle etme potansiyeli araştırılmaktadır. Ayrıca, beyin işlevi ile ilgili olarak kognitif süreçler, hafıza ve öğrenme üzerinde olumlu etkiler

sağlayabileceği ve öğrenme ile hafıza süreçlerini destekleyebileceği bildirilmektedir (Friedrich ve ark., 2020; Friedrich ve Stengel, 2021a; Kulinska ve ark., 2021).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Deney Hayvanları

Yapılan çalışma için 17/05/2022 tarihinde Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışmada kullanılan erişkin erkek Wistar albino sıçanlar (n=40); 38.2022.mar onay numarası ile İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel TIP Enstitüsü (DETAE)'nden temin edildi. Tüm hayvanlar uygun kafesler içinde, 12 saat aydınlık-karanlık ortamında, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile ad libitum beslendi.

Çalışma grupları aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

1. Yalancı cerrahi işlem uygulanan grup (Kontrol grubu)
2. Cerrahi işlem ile İskemi/Reperfüzyon yapılan grup (İskemi/Reperfüzyon (İ/R) grubu)
3. 5µg/kg PNX-14 uygulanan grup (PNX-5 grubu)
4. 25µg/kg PNX-14 uygulana grup (PNX-25 grubu)
5. 50µg/kg PNX-14 uygulana grup (PNX-50 grubu)

5.2.Global Serebral İskemi Modeli

İskemi sıçan modeli, 250-350 g ağırlığındaki yetişkin Wistar Albino sıçanları (her grup n = 8) kullanılarak oluşturuldu. İskemi işlemleri için sıçanlara derin anestezi uygulandı. [(ketamin (100 mg/kg, i.p.) ve ksilazin hidroklorid (30 mg/kg, i.p.)]. Servikal ön bölge tıraşlanıp orta hat kesisi yapılarak bilateral paratrakeal bölge küt diseksiyonla açıldı. Vagus siniri karotis arterlerden ayrıldıktan sonra, izole edilen sol common karotis arterine anevrizma klipsi yerleştirilerek 30 dakika boyunca iskemi yapıldı. Otuz dakika sonunda klips çıkarılıp kan akımı kontrol edilerek cilt kapatıldı. 24 saatlik bir reperfüzyon süresinden sonra sıçanlardan kardiyak kan alınarak yaşamları sonlandırıldı (Acar Arslan, 2019). Kontrol grubu sıçanlarda boyunda kesi yapılıp, paratrakeal bölge açığa çıkarıldı ve 30 dakika sonunda sütürle kapatıldı.

5.3.Phoenixin 14 Tedavisi

Gerçekleştirilen akut iskemi modelinde hayvanlara 24 saat içerisinde 2 doz cilt altı düşük (5 ug/kg), orta (25 ug/kg), yüksek (50 ug/kg) olmak üzere Phoenixin 14 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Kat. No: 079-01) tedavisi uygulandı. İlk doz 30 dakika iskemi sonrasında, 2. doz ise reperfüzyonun 20. Saatinde uygulandı.

5.4. Nörolojik Hasar Değerlendirmesi

Deney grubu hayvanlara reperfüzyonun 21. saatinde nörolojik hasar değerlendirilmesi için modifiye Bederson'un nörolojik muayenesi yapıldı (Bederson ve ark., 1986; Ogan, 2003). Aşağıdaki tabloda gösterilen kriterler göz önüne alınarak motor ve davranış bozukluklarını değerlendirmek için 20 puanlık nörolojik skor (Tablo 1) kullanıldı. Kısaca bilinç, düzgün bir tırmanma platformundaki performans, ekstremité tonusu, yürüme ve postüral refleksler, daire çizme ve nosiseptif uyaranlara yanıt değerlendirildi.

BİLİNÇ	Normal	0
	Huzursuz	1
	Letarji	2
	Stupor	3
	Nöbet	4
	Koma	5
TIRMANMA PLATFORMU	Tırmanıyor	0
	Arka bacak üzerinde duruyor	1
	>5 sn asılı kalıyor	2
	<5 sn asılı kalıyor	3
	Yakalama refleksi yok	4
EKSTREMİTE TONUSU	Normal	0
	Zayıf	1
YÜRÜME	Normal	0
	Hipomobilité	1
	Pençe addüksiyon	2
	Paratik tarafa dönme	3
	Ayakta duramıyor	4
ROTASYON TESTİ	>1 sn 180 derece	0
	<1 sn 180 derece	1
	1-3 sn 90 derece	2
	<1 sn 90 derece	3
	1-3 sn 45 derece	4
	<1 sn 45 derece	5
AĞRI YANITI	<1 sn uyarıya normal	0
	>1 sn uyarıya hipoaktif	1
TOPLAM		0-20 arası

Tablo 1. Bedersonun Modifiye Nörolojik Muayene Puanlaması (Bederson vd., 1986).

5.5. Davranış Testleri

Global iskemi-reperfüzyon oluşturulan sıçanlara reperfüzyonun 22-23 ve 24. saatlerinde sırasıyla lokomotor aktivite testi, Rotarod testi ve pati dokunma testi uygulandı. Tüm davranış testleri kör bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi

5.5.1. Lokomotor Aktivite Testi

Tüm sıçanlara, lokomotor aktivite çemberinde (MAY ACT 508, Aktivite Görüntüleyici Sistem/Animal Locomotor Activity Meter: Commat Ltd., Türkiye) lokomotor aktivite değerlendirmesi yapıldı. Genel lokomotor aktivite ve deney hayvanının kafes içindeki pozisyonu fotosel ışınlarının kesilmesi ile belirlenir. Eğer lokasyon tamamen değişirse bu kayıt ambulatuvar aktivite olarak kabul edilir. Dolayısıyla ambulatuvar hareket, deneğin kafes içinde dikilme (dinlenme/durma hareketi) haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme (gezinme/katedilen mesafe) hareketidir. Toplam lokomotor aktivite ise vertikal, horizontal ve ambulatuvar hareketlerin toplamı şeklinde ifade edilmektedir. Parametreleri test etmek için deney hayvanı açık alanın tam ortasına konmuş ve 10 dk boyunca kayıt alındı. Deney başında normal lokomotor aktiviteye sahip olduğu belirlenen hayvanlar deneye dâhil edildi. Deney sonunda lokomotor değerlendirme tekrarlandı. Hayvanlar tek tek çember içine yerleştirildi ve lokomotor aktivite parametreleri bilgisayarlı sistem (Activity yazılımı) ile değerlendirildi (Culpan vd., 2024).

5.5.2. Rotarod testi

Deneye dahil edilen her bir sıçan, iskemi modeli oluşturulmadan önce, hızlanan rotarod mili üzerinde kalmak ve daha sonraki değerlendirmeler için temel referansı ölçmek amacıyla 100 saniye boyunca 8 rpm'lik sabit bir hızda eğitildi. Her bir sıçan, rotarodun (Mayıs RR 0903 Animal Rota-Rod, Commat Ltd., Türkiye) asılı kirişine, yüzü deneyiciden uzağa bakacak şekilde yerleştirildi ve sıçanlara 5 dakikalık bir kesme periyoduyla 4-40 rpm hızında hızlanan rotarod mili üzerinde test gerçekleştirildi ve gruplar kendi aralarında değerlendirildi (Culpan vd., 2024).

5.5.3. Pati Dokunma Testi

Deney gruplarındaki hayvanlar rastgele seçilerek 25 cm çapında 40 cm yüksekliğinde pleksiglas silindir içerisine yerleştirildi. 2 dk boyunca sağ/sol pati dokunma sayısı gözlemci tarafından sayılıp kayıt altına alındı ve gruplar kendi aralarında değerlendirildi (Roome ve Vanderluit, 2015).

5.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Anestezi altında iken kardiyak kan alınması sonrasında tüm gruplardaki hayvanlardan beyin dokuları çıkarılıp homojenize edildi. Doku homojenatları Glutasyon (GSH), Lipit peroksidasyonu (LP), Miyeloperoksidaz (MPO) ve ROT için değerlendirildi.

5.6.1. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü

Doku MPO aktivitesi, dokuda nötrofil infiltrasyonunu gösteren biyokimyasal bir parametredir. Bu amaçla beyin dokusu örnekleri %0,5 'lik HETAB (50mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH 6) homojenize edildikten sonra, 12,000 rpm'de 10 dk, 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet 50 mM potasyum-fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edildi. Daha sonra her bir tüpe 50 mM potasyum fosfat tamponu + o-dianisidin. 2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + örnek konulmuş ve oda ısısında 3 dk inkübasyon sonrası reaksiyon %2'lik sodyum azid ile durduruldu. Daha sonra absorbans değerleri 460 nm'de okundu (G. Şener ve ark., 2006).

5.6.2. Lipit Peroksidasyonu ve Glutasyon tayini

Oksidan hasarın bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyinin ve dokudaki endojen antioksidan glutasyon miktarının ölçüldüğü bu yöntemde, doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorik asit solüsyonu ile homojenizasyonu takiben 3,000 devir ve 4°C 'de 15 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılıp 10,000 devirde 8 dk daha santrifüje edildi ve lipid peroksidasyon düzeyi MDA cinsinden spektrofotometrik ölçümle ifade edildi. Glutasyon ölçümlerinde, modifiye Ellman yöntemi kullanıldı ve GSH miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi (Şener ve ark., 2006).

5.6.3. Reaktif Oksijen Türleri Aktivite Değerlendirmesi

Reaktif oksijen türlerinin ışık yayan kimyasal reaksiyonları bir lüminometre (Junior LB 9509, EG&G, Almanya) ile ölçüldü. Ölçümlerden önce beyin doku örnekleri yaklaşık 20-25 mg olacak şekilde parçalandı ve PBS (500 mM) + HEPES [20 mM 4- (2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit, N-(2-Hidroksietil) piperazin-Np-(2-etansülfonik asit)] içeren test tüpleri içerisine konuldu. Lusigenin (bis-N-metilakridium nitrat) arttırıcılar, DMSO içinde seyreltildi ve PBS + HEPES ve doku örnekleri içeren test tüplerine nihai konsantrasyonu 0,2 mmol/L (4µl) olacak şekilde ilave edildi. Okumalar 5 dk boyunca 1 dk'lık periyotlarda yapıldı. Lucigenin CL ölçümlerinden sonra 5 dk'lık bir sayım periyodu için sonuçlar, ıslak ağırlığa kıyasla eğri altındaki alan (AUC) olarak hesaplandı ve göreceli ışık birimi / mg doku (rlu/ mg doku) olarak verildi (Özbeyle ve ark., 2020).

5.7. Işık Mikroskopik İncelemeler

5.7.1. Mikroskopik Preparasyon ve Değerlendirmeler

Ötenazi sonrası tüm gruplardaki hayvanlardan alınan beyin dokuları ışık mikroskopik incelemeler için nötral tamponla hazırlanmış %10'luk formalin içine alınıp 72 saat fikse edildi. Fikse edilen doku örnekleri yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilip, ksilende şeffaflandırmanın ardından bir gece boyunca parafin içerisinde 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından bloklanan dokulardan morfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için mikrotom (Leica RM2125 RTS) yardımıyla ortalama 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler histopatolojik semi-kantitatif analizlerde kullanılmak üzere Hematoksilen ve eozin (H&E) boyası ile boyandı. Kesitler Olympus DP72 CCD kamera ataçmanlı Olympus BX51 mikroskobu (Tokyo, Japonya) ile değerlendirilerek görüntüledi Nöronal hasar değerlendirmesi sem-kantitatif olarak yapıldı (0: yok, 1: hafif, 2: orta 3: şiddetli) (Ozdemir-Kumral ve ark., 2024).

Beyin dokuları ayrıca 1 mm³ boyutunda parçalar haline getirildikten sonra %2,5'luk 0,1 M PBS tamponlu (pH 7,2) glutaraldehit fiksativi içerisine konarak +4°C'de 12 saat fikse edildi. Dokular PBS'e alınıp daha sonrasında %2'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyonu yapıldı. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra propilen oksitten geçirilip şeffaflandırdıktan sonra son olarak epona gömülerek 60°C'deki etüvde 1 gece boyunca bekletildi. Epon bloklarından alınan 1µm kalınlığında yarı ince kesitler toludin mavisi boyası ile boyandı. Kesitler daha sonra Olympus DP72 CCD kamera ataçmanlı Olympus BX51 mikroskobu (Tokyo, Japonya) ile incelendi ve fotoğraflandı.

5.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Parafin kesitler 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dakika tutulup, %96'luk alkolde 2 kere 10 dakika bekletildikten sonra endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika bekletildi. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tamponda (pH 6.0, 60°C'de) 20 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı, oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitler PBS ile 2 kere 5 dakika yıkandıktan sonra blokama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Beyin kesitleri gece boyunca Kaspaz-3 (cas-3) (1:500, Thermo Fisher Scientific (Wilmington, DE), Kat. No: PA5-120488),

GFAP (1:500, Merck Millipore, Kat. No: MAB360) ve BDNF (1:10000, Abcam Kat. No: ab213323) primer antikorları ile inkübe edilip, ardından biyotinlenmiş sekonder antikorlar ve streptavidin-peroksidaz konjugatları (HistostainPlus Kit, Invitrogen, CA, USA) ile inkübasyon yapıldı. PBS içinde yıkanan kesitler sıvı diaminobenzidin (Histostain Plus Kiti, Invitrogen, CA, ABD) ile ortaya çıkarılıp hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. İmmünreaktivite semikantitatif olarak değerlendirildi (1: zayıf immünreaktivite, 2: orta immünreaktivite, 3: güçlü immünreaktivite).

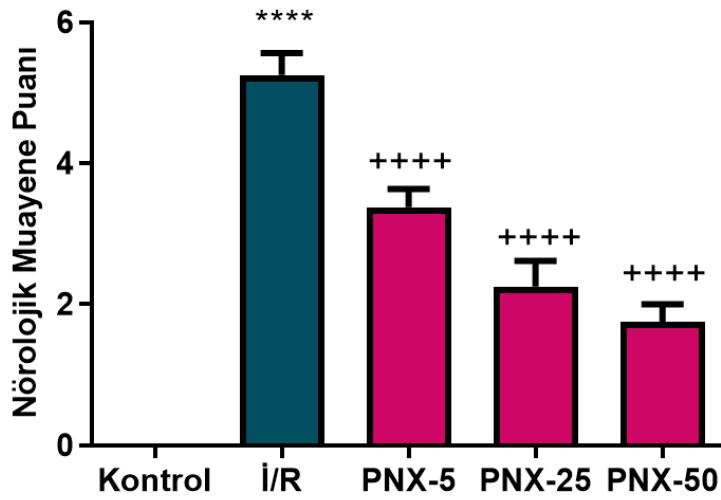
5.8.İstatistiksel Analizler

Histolojik, biyokimyasal ve davranışsal analizlerden alınan verilerin değerlendirmesi Graph-Pad Prism 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey testi kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. Nörolojik Hasar Değerlendirmesi

Reperfüzyonun 21. saatinde tüm deney grubu hayvanlara yapılan nörolojik muayene değerlendirmesinde, İskemi/Reperfüzyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı artan nörolojik hasar skorunun ($p<0,0001$), PNX-14 tedavisi uygulanan tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. ($p<0,0001$).



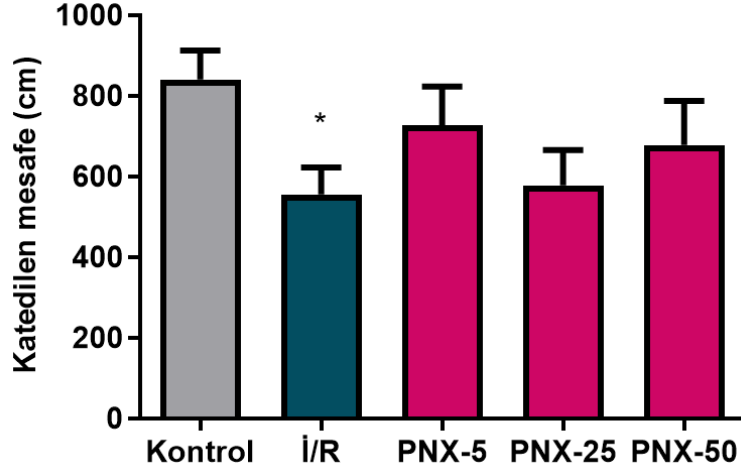
Şekil 6. Deney grupları nörolojik muayene değişimi.

****: $p<0,0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında, +++++: $p<0,000$ İ/R grubu ile karşılaştırıldığında

6.2. Davranış Testleri

6.2.1. Lokomotor Aktivite Değerlendirmesi

Reperfüzyonun 22. saatinde tüm deney grup hayvanları lokomotor aktivite cihazında gözlemlendi. Hayvanların lokomotor aktivite çemberinde dolaşma mesafeleri karşılaştırıldığında, İskemi/Reperfüzyon grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalırken ($p<0,05$), PNX-14 tedavi gruplarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

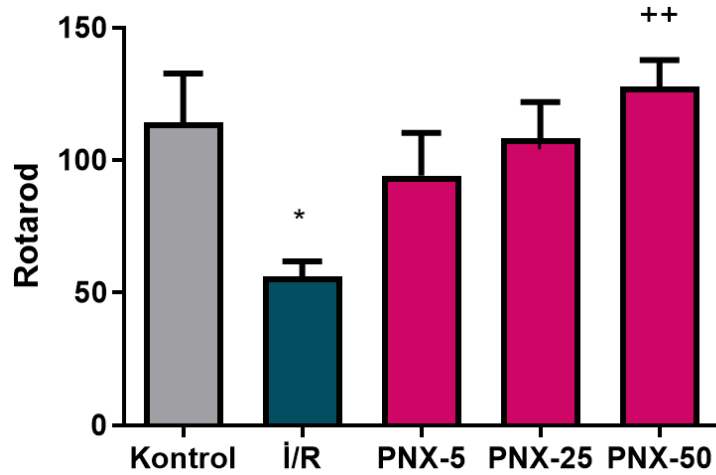


Şekil 7. Deney grupları dolaşma mesafeleri.

*: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

6.2.2. Rotarod Testi

Reperfüzyonun 23. saatinde tüm deney grup hayvanları rotarod cihazına yerleştirildi ve yapılan değerlendirme sonucunda, kontrol grubu hayvanlarla karşılaştırıldığında İskemi/Reperfüzyon grubu hayvanların cihaz üzerinde dengede kalma süreleri anlamlı oranda azalırken ($p < 0,05$) $50\mu\text{g/kg}$ PNX-14 uygulanan grup hayvanların dengede kalma süreleri anlamlı oranda arttı ($p < 0,01$).

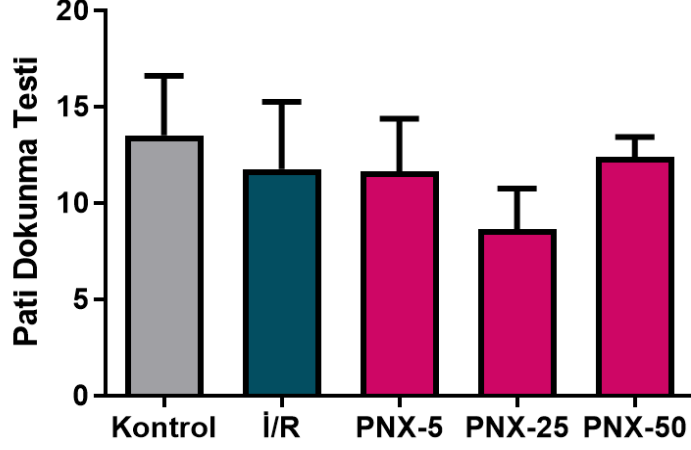


Şekil 8. Deney grupları Rotarod cihazında kalma süreleri.

*: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ++: $p < 0,01$ İ/R grubu ile karşılaştırıldığında

6.2.3. Pati Dokunma Testi

Reperfüzyonun 24. saatinde tüm deney grup hayvanlarının sağ pati dokunma sayıları değerlendirildiğinde, gruplar arası anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

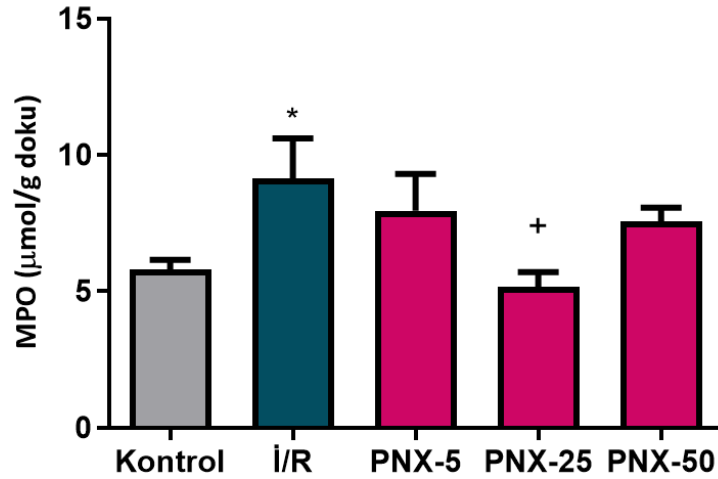


Şekil 9. Deney grupları sağ pati dokunma grafiği.

6.3. Biyokimyasal Değerlendirmeler

6.3.1. Miyeloperoksidaz Aktivitesi

MPO aktivitesi ölçümü değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında İskemi/Reperfüzyon grubunda artan ($p < 0.05$) MPO aktivitesinin 25 $\mu\text{g/kg}$ PNX-14 uygulanan tedavi grubunda anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$).

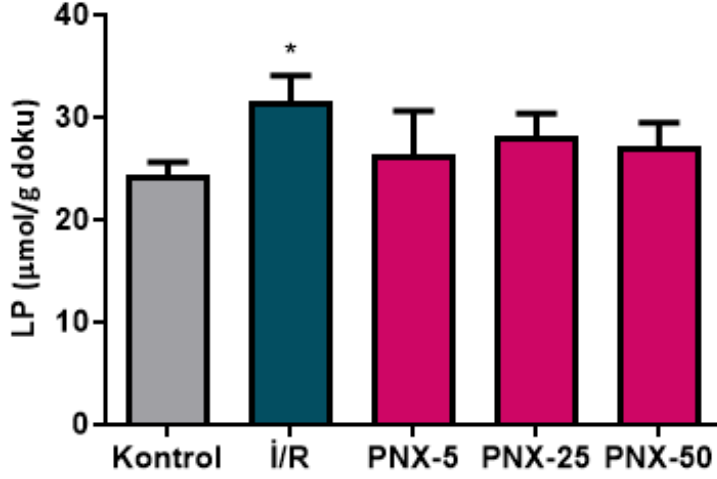


Şekil 10. Deney grupları MPO aktivitesi.

*: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, +: $p < 0,05$ İ/R grubu ile karşılaştırıldığında

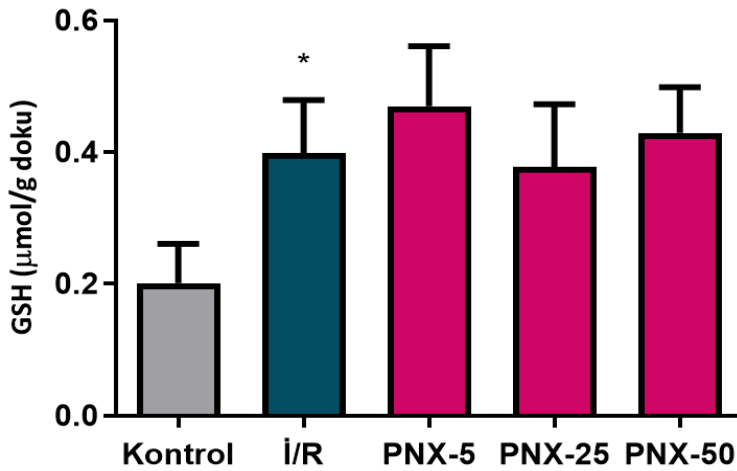
6.3.2. Lipit Peroksidasyonu ve Glutasyon Aktivitesi

LP ölçümü değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında İskemi/Reperfüzyon grubunda artan LP aktivitesi ($p<0,05$) gözlemlendi. PNX-14 uygulanan tedavi gruplarında anlamlı bir farklılık izlenmedi. Antioksidan glutasyon seviyeleri değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında İskemi/Reperfüzyon grubunda anlamlı oranda artış ($p<0,05$) izlendi. PNX-14 uygulanan tedavi gruplarında glutasyon seviyesinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.



Şekil 11. Deney grupları LP düzeyleri.

*: $p<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

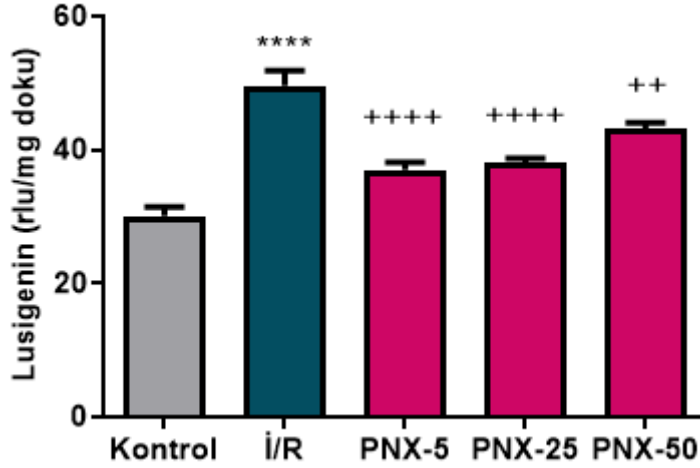


Şekil 12. Deney grupları GSH düzeyleri.

*: $p<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

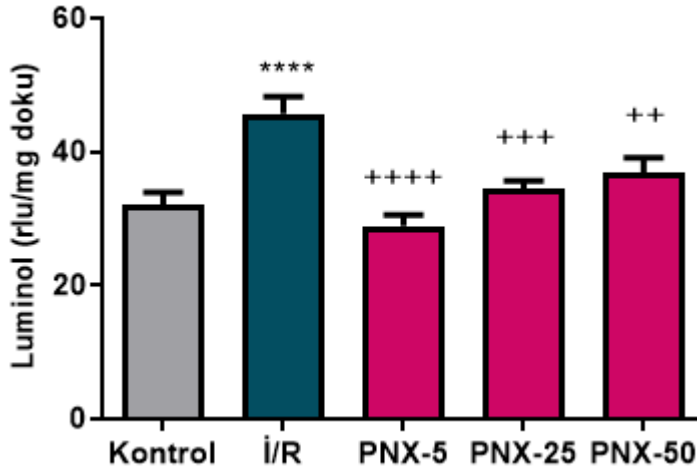
6.3.3. Kemilüminesans Ölçümleri

Reaktif oksijen molekülleri miktarının değerlendirildiği lusigenin ve luminol analiz değerlendirmesine göre, kontrol grubuna kıyasla İskemi/Reperfüzyon grubunda anlamlı orandaki artışın ($p<0,0001$) PNX-14 tedavisi uygulanan tüm gruplarda anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi ($p<0,01-0,0001$).



Şekil 13. Deney grupları lusigenin düzeyleri.

****: $p<0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, +++++: $p<0,0001$ ++: $p<0,01$ İ/R grubu ile karşılaştırıldığında



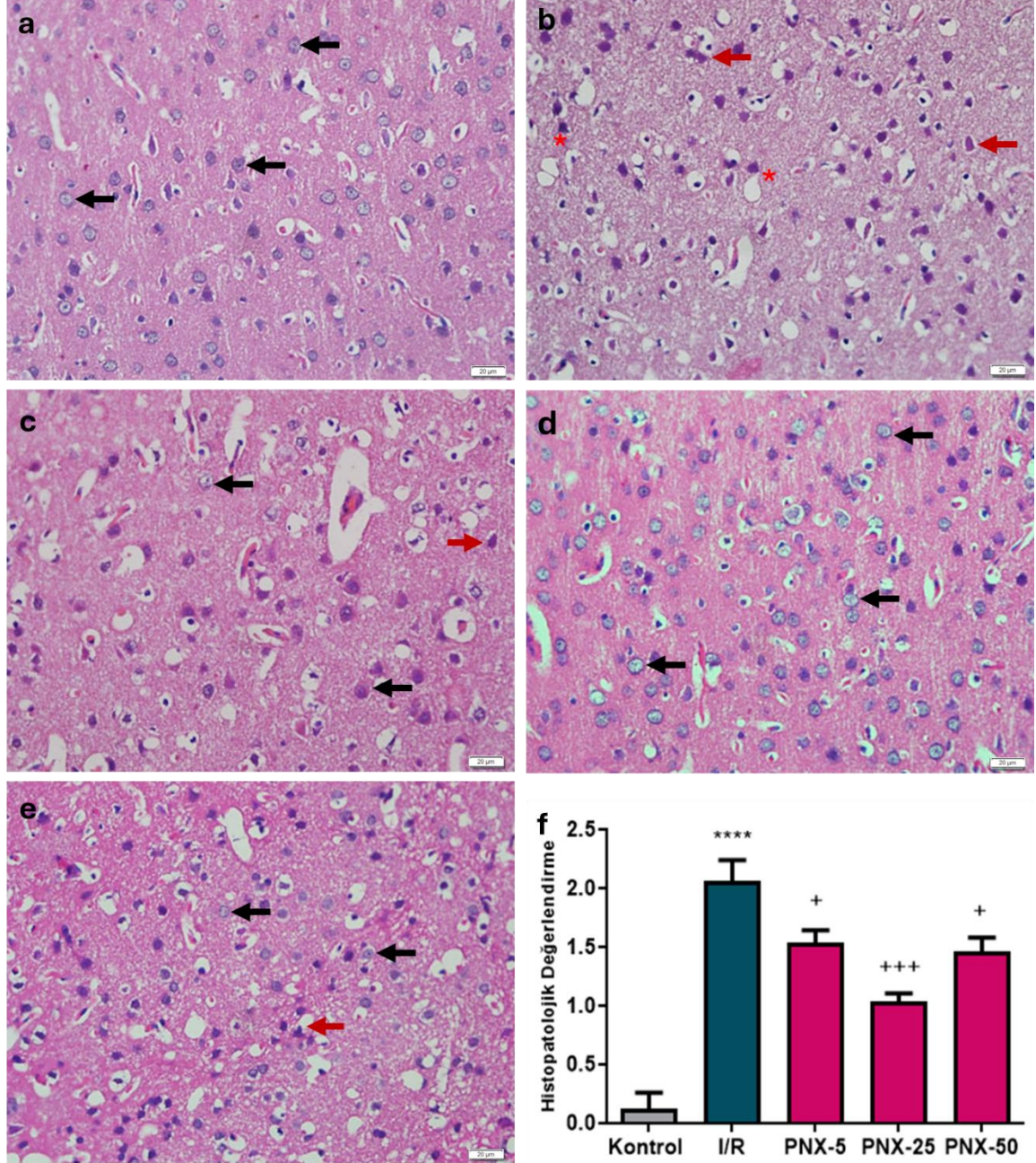
Şekil 14. Deney grupları luminol düzeyleri.

****: $p<0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, +++++: $p<0,0001$ ++: $p<0,01$ İ/R grubu ile karşılaştırıldığında

6.4. Histopatolojik Bulgular

Deney grubu hayvanların beyin dokusu korteks bölgesi histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı oranda artan histolojik skor İskemi/Reperfüzyon grubunda ($p<0,0001$) düzensiz morfoloji, hasarlı nöronal gövde yapısı (kırmızı ok), bozulmuş nöropil yapısı (kırmızı yıldız) ile izlenmekteydi. PNX-14 tedavisi uygulanmış tedavi gruplarında ($p<0,01-0,001$) ise, İskemi/Reperfüzyon grubuna kıyasla

anamlı oranda azalan histolojik skor ile, daha düzgün yerleşimli hücre morfolojisi, artan sağlıklı nöronal gövde yapısı (siyah ok) ve azalan hasarlı nöron gövdesi (kırmızı ok) gözlemlendi (Şekil 16).

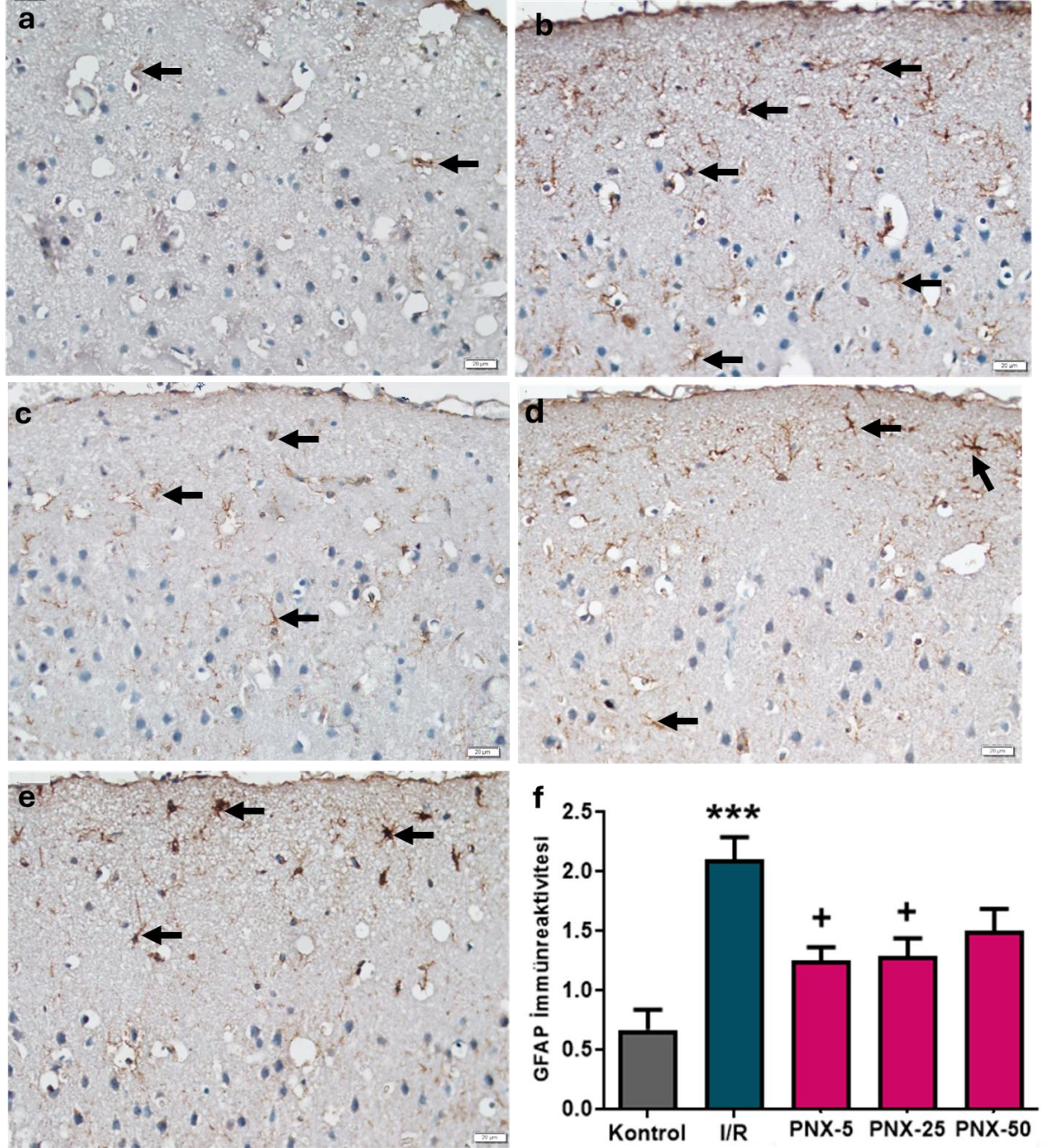


Şekil 16. Deney gruplarına ait histopatolojik değerlendirme.

Serebral korteks tabakası H&E. Ölçek: 20 µm. a: kontrol grubu. b: I/R grubu, c: PNX-5 grubu, d: PNX-25 grubu, e: PNX-50 grubu. Siyah oklar düzgün morfolojili nöronları kırmızı oklar hasarlı nöronları işaret etmektedir. “*”: nöropilde bozulma. f: Histopatolojik değerlendirme grafiği. **** p<0,0001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, + p<0,05 +++ p<0,001 I/R grubu ile karşılaştırıldığında

6.5.İmmünohistokimyasal Bulgular

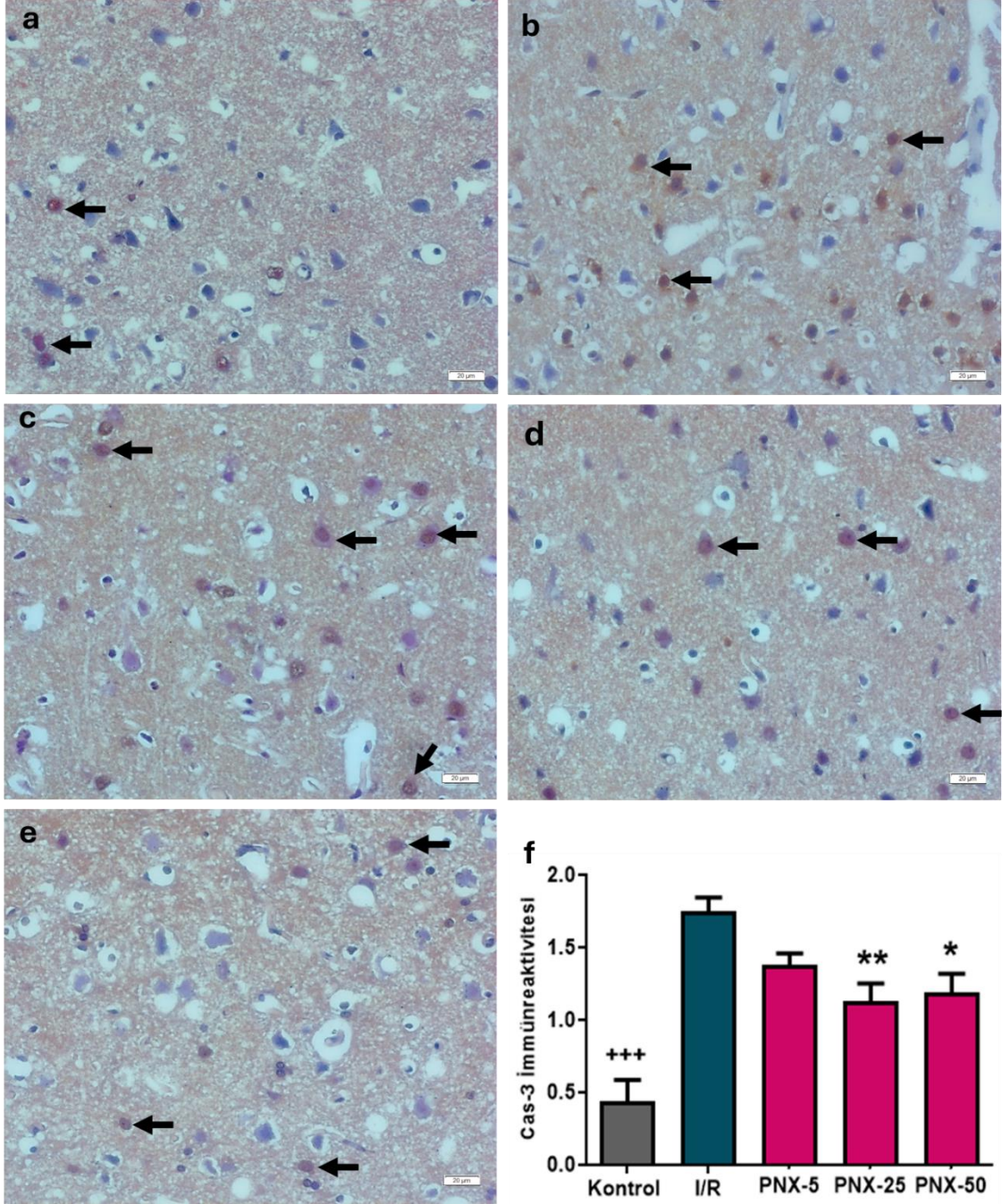
GFAP-pozitif immünreaktivite tüm beyin bölgelerinde gözlemlendi. Tüm deney grubu hayvanların korteks bölgesi incelendi, kontrol grubu ile kıyaslandığında İskemi/Reperfüzyon grubunda ($p<0,001$) anlamlı oranda artan aktifleşmiş astrogliozisin özellikle 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PNX-14 uygulanan tedavi gruplarında ($p<0,05$) anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Deney gruplarına ait GFAP immünreaktivite değerlendirmesi.

Serebral korteks tabakası. Ölçek: 20 µm. **a:** kontrol grubu, **b:** I/R grubu, **c:** PNX-5 grubu, **d:** PNX-25 grubu, **e:** PNX-50 grubu. Siyah oklar GFAP-pozitif hücreleri işaret etmektedir. **f:** GFAP immünreaktivite skor grafiği. ***: $p<0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, +: $p<0,05$ I/R grubu ile karşılaştırıldığında.

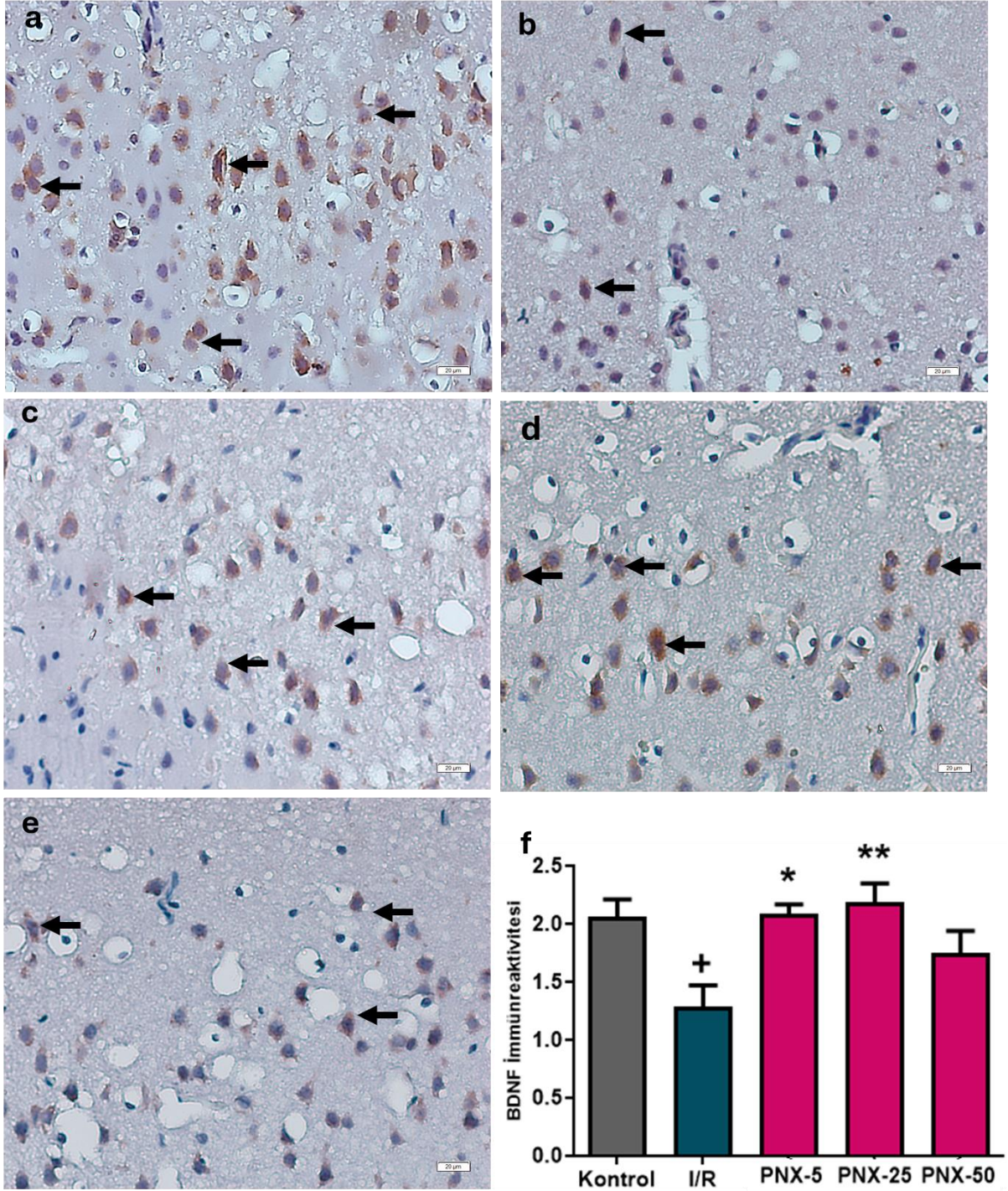
Caspase-3 immünreaktivitesi korteks bölgesi değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla İskemi/Reperfüzyon grubu hayvanlarda artan ($p<0,001$) apoptotik aktivitenin özellikle 25 µg/kg ve 50 µg/kg PNX-14 uygulanan tedavi gruplarında anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi ($p<0,05-0,01$) (Şekil 18).



Şekil 18. Deney gruplarına ait Cas-3 immünreaktivite değerlendirmesi.

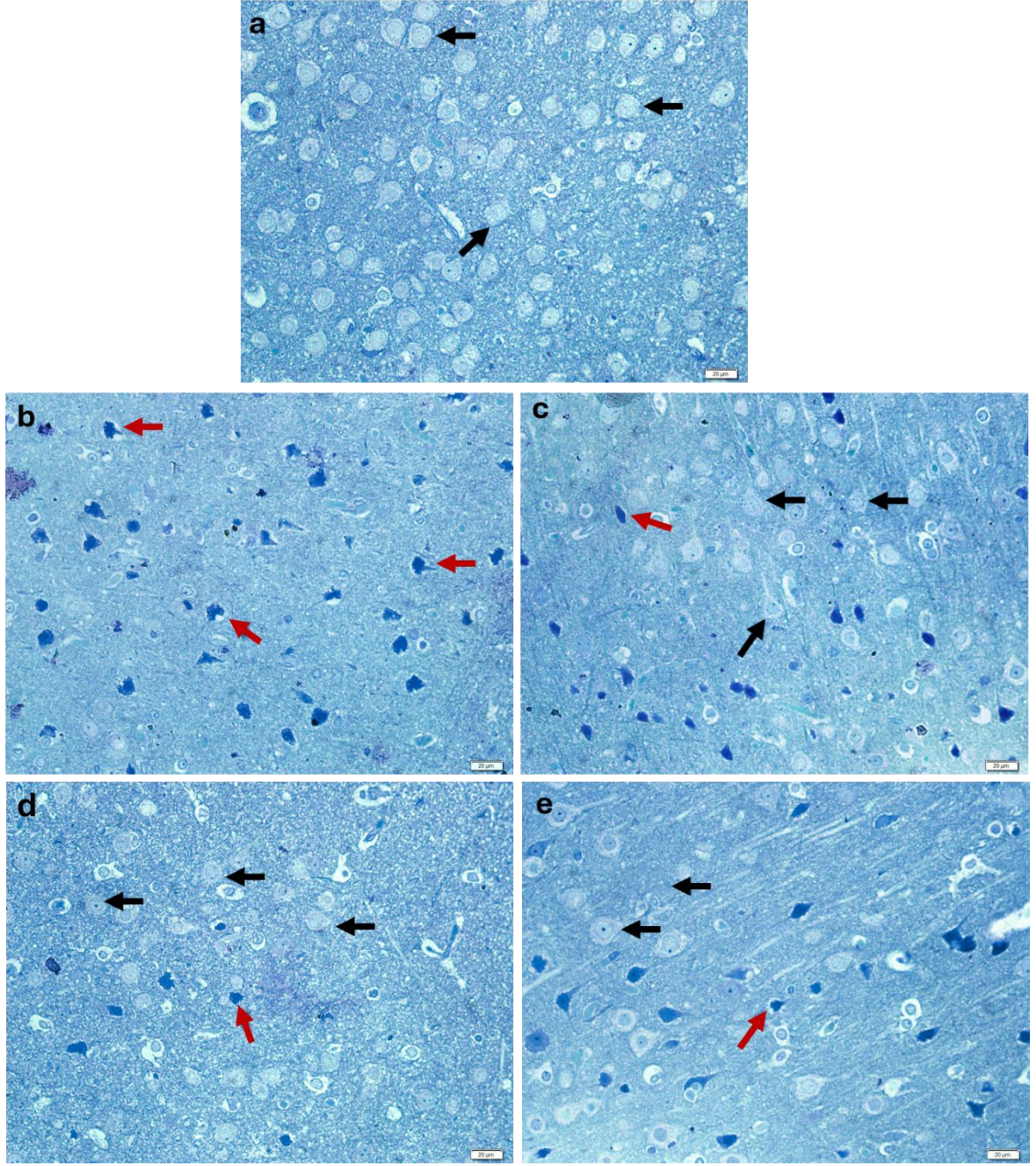
Serebral korteks tabakası Ölçek: 20 µm. **a:** kontrol grubu, **b:** İ/R grubu, **c:** PNX-5 grubu, **d:** PNX-25 grubu, **e:** PNX-50 grubu. Siyah oklar cas-3-pozitif hücreleri işaret etmektedir. **f:** Cas-3 immünreaktivite skor grafiği. +++: p<0,001 I/R grubu ile karşılaştırıldığında **: p<0,01 *: p<0,05 I/R grubu ile karşılaştırıldığında.

BDNF immünreaktivitesi tüm beyin bölgelerinde gözlemlendi. Korteks bölgesi değerlendirildiğinde, İskemi/Reperfüzyon grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı oranda azalmış immünreaktivitenin özellikle 5 µg/kg ve 25 µg/kg PNX-14 uygulanan tedavi gruplarında anlamlı oranda arttığı gözlemlendi (p<0,05-0,01) (Şekil 19).



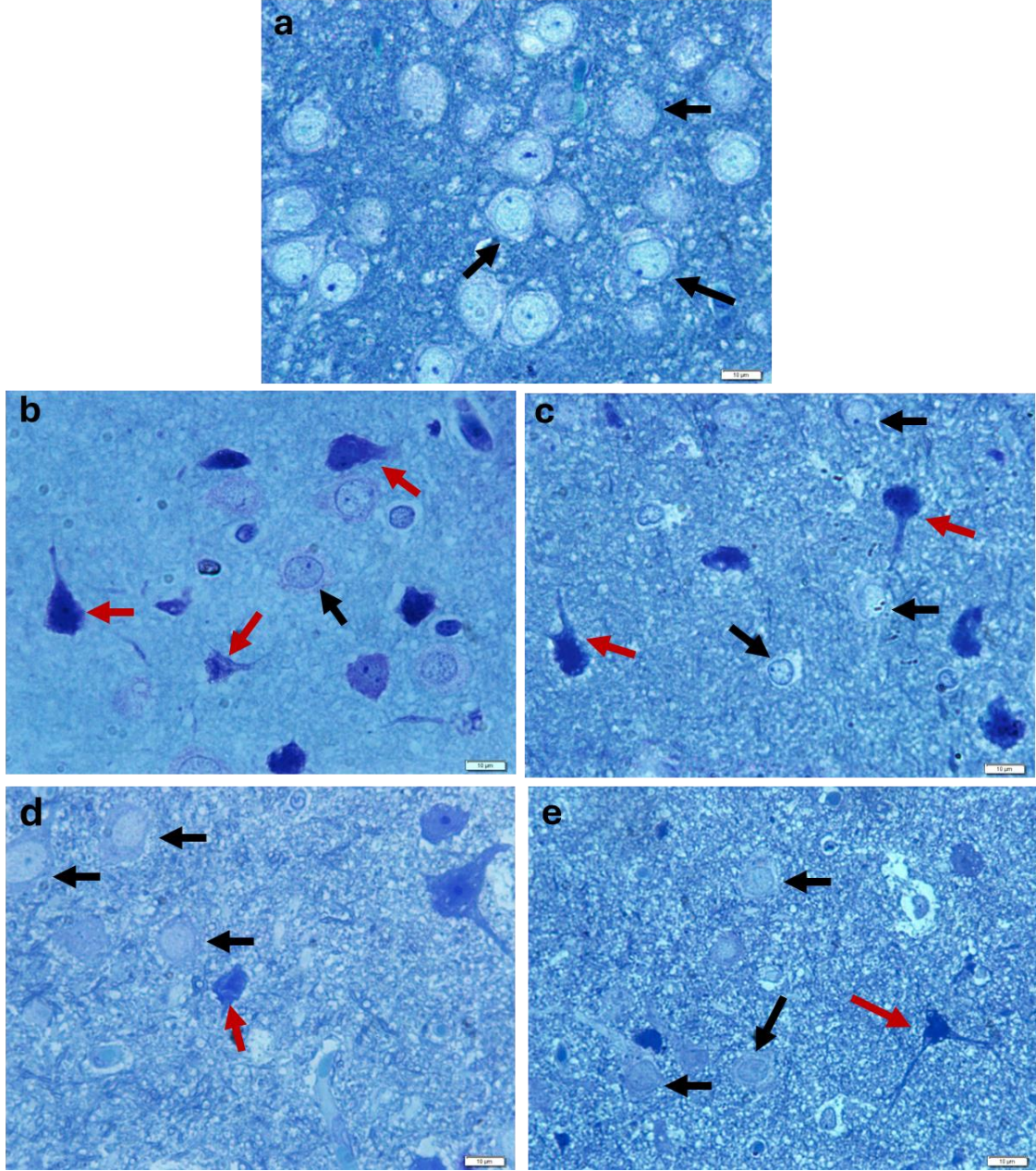
Şekil 19. Deney grupları BDNF immünreaktivite değerlendirmesi.

Serebral korteks tabakası Ölçek: 20 µm. **a:** kontrol grubu, **b:** I/R grubu, **c:** PNX-5 grubu, **d:** PNX-25 grubu, **e:** PNX-50 grubu. Siyah oklar BDNF-pozitif hücreleri işaret etmektedir. **f:** BDNF immünreaktivite skor grafiği. +: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **: $p < 0,01$ *: $p < 0,05$ I/R grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 20a. Yarı ince epon kesitler. Toluidin mavisi.

Ölçek 20 µm. Serebral korteks tabakası. **a:** Kontrol grubu, **b:** I/R grubu, **c:** PNX-5 grubu, **d:** PNX-25 grubu, **e:** PNX-50 grubu. Siyah oklar düzgün morfolojili nöronları kırmızı oklar hasarlı nöronları işaret etmektedir.



Şekil 20b. Yarı ince epon kesitler. Toluidin mavisi.

Ölçek 10 µm. Serebral korteks tabakası. **a:** Kontrol grubu, **b:** I/R grubu, **c:** PNX-5 grubu, **d:** PNX-25 grubu, **e:** PNX-50 grubu. Siyah oklar düzgün morfolojili nöronları kırmızı oklar hasarlı nöronları işaret etmektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sol common karotis arter tıkanıklığı ile indüklenen global serebral iskemi modeli uyguladığımız çalışmamızda nörolojik skor artmış, motor fonksiyon bozulmuş ve reaktif oksijen türleri artmış olarak izlendi. Bununla birlikte PNX-14'ün, antioksidan etki göstererek, histopatolojik hasarın derecesinde azalma ile beraber aktive astroglizisi ve nöronal apoptozu azaltarak iskemi/reperfüzyonla ilişkili nörolojik hasarı hafiflettiği görüldü.

İnmede beynin etkilenen bölgesine göre hareket ve koordinasyon kaybı, bellek ve bilişsel bozukluk gibi çok çeşitli davranışsal ve bilişsel etkiler görülebilir (Langhorne ve ark., 2011). Literatürde ilk etapta önemli olan nörolojik hasarın seviyesini belirlemek olsa da ardından çeşitli davranış testleri gerçekleştirilmektedir. Sıçan fokal iskemi modelinde insan mikroglia transferinin ve modifiye kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin koruyucu etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda nörolojik hasar tespiti yapılmış ve hasarın anlamlı ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Lu ve ark., 2016; Narantuya ve ark., 2010). Biz de global serebral iskemi modeli oluşturarak sıçanlarda PNX-14'ün etkilerini araştırdığımız çalışmamızda iskemi/reperfüzyon kaynaklı artan nörolojik hasarın anlamlı ölçüde azaldığını gözlemledik.

Serebral iskemi modeli çalışmaları göz önüne alındığında iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası motor fonksiyon bozulmaları meydana gelmekte ve hasar davranış testleri ile de ortaya konmaktadır. Geçici fokal iskemi modelinin kullanıldığı bir çalışmada lokomotor aktivite sonuçlarının beyin enfarktüs alanı ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Shen ve Wang, 2010).

Prenatal dönemde iskemiye maruz bırakılan sıçanların yetişkin dönemde kas-iskelet sistemi bozuklukları sergilediği, insan kaynaklı saç folikülü kök hücre tedavisinin iskemik hasar üzerindeki etkilerinin incelendiği ve menopoza döneminde günlük genistein kullanımının iskemik koşullara etkisinin değerlendirildiği çalışmalardan elde edilen bulgular, iskemik koşulların motor fonksiyonlarda anlamlı bozulmalara yol açtığını ve bu bozulmaların rotarod ve lokomotor aktivite testleriyle objektif olarak değerlendirilebildiğini göstermektedir (Delcour ve ark., 2011; Genc ve ark., 2023; Oppong-Gyebi ve ark., 2022). Bu çalışmalarla paralellik gösteren sonuçlarımız, iskemi/reperfüzyon kaynaklı motor fonksiyon bozukluğunu ve uyguladığımız PNX-14 tedavisi ile anlamlı oranda bu bozulmanın azaldığını, dolayısıyla PNX-14'ün koruyucu etkisini göstermektedir.

Klinik çalışmalarda, oksidatif hasar ve inflamasyonun göstergesi olarak değerlendirilen MPO seviyeleri, bazı durumlarda sistemin normal bir yanıtı olarak da yorumlanabilmektedir. İnme sırasında beyin dokusunda meydana gelen hasar ve inflamatuvar yanıtlar, MPO aktivitesinin artmasına yol açar. Yüksek MPO seviyeleri hem iskemik hem de hemorajik inme durumlarında görülmekte olup, bu durumlar beyinde meydana gelen oksidatif hasarı ve iltihabi yanıtları yansıtmaktadır (Chehaibi ve ark., 2016; Ganz ve ark., 2017). Benzer şekilde, hücrelerde glutasyon (GSH) aktivitesi ve lipid peroksidasyonu da oksidatif stres sürecinde önemli rol oynayan iki temel mekanizma olarak değerlendirilir. İndirgenmiş glutasyon, hücrelerde zararlı serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif stresi düzenlemede kritik bir antioksidan görevi üstlenmektedir. Bu bağlamda, inme gibi iskemik durumlarda MPO seviyelerindeki artış, glutasyon aktivitesinin azalması ve lipid peroksidasyonunun artması ile ilişkili olabilir. Hem MPO hem de glutasyon seviyeleri, oksidatif stresin ve inflamasyonun değerlendirilmesinde önemli belirteçlerdir ve bu süreçlerin hepsi, iskemik hasarın patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. İskemi sonrası yeniden serebral kan akışının sağlanmasının etkileri, hem serebral iskemide hem de miyokard enfarktüsünde farmakolojik etkinliklerin sonucu ve serebral iskemide ginsengin koruyucu etkisinin değerlendirildiği çalışmalar göz önüne alındığında iskemik kaynaklı MPO aktivitesinin arttığı görülmektedir (Guan ve ark., 2023; R. Liu ve ark., 2024a; W. Liu ve ark., 2023). Reperfüzyon sonrası dokuları incelediğimizde, iskemik/reperfüzyon nedeniyle değişen MPO aktivitesi, LP ve GSH seviyelerinin PNX-14 tedavisi ile değiştiğini gözlemledik. Bu değişimlerin PNX-14'ün olası antioksidan etkisinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

Biyolojik örneklerde ROT'un belirlenmesi için kullanılan kemilüminesans yöntemleri olarak da bilinen; lusigenin spesifik olarak süperoksit oluşumunu algılamada hassas iken luminol oksidatif stres çalışmalarında ve inflamatuvar yanıtın izlenmesinde kullanılmaktadır (C.-W. Li ve ark., 2020; H. Zhang, 1999). İskemi/reperfüzyon çalışmalarında da yaygın olarak kullanılan bu ajanlar, özellikle iskemiyeye bağlı oksidatif stres kaynaklı hasarı ve ROS üretimini incelemek için ideal bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Abdul-Sabour Ahmed Bader, 2023; Fang ve ark., 2013; G. Şener ve ark., 2006; T. E. Şener ve ark., 2015). Dekapitasyon sonrası taze beyin dokusunda yaptığımız incelemeye göre kontrol dokusuna göre iskemik/reperfüzyon grubu lusigenin ve luminol ışımalarında literatüre uyumlu şekilde anlamlı artış olduğunu gözlemledik. Uyguladığımız PNX-14 tedavisi ile beyin dokusundaki süperoksit ve ROT oluşumunda anlamlı oranda azalma, PNX-14'ün antioksidan etkisini desteklemektedir.

İskemi modeli uygulanan çalışmalarda etkilenen doku bölgesinde hücresel düzeyde dejenerasyon, nekrotik hücre yapısı, piknotik çekirdek, genişlemiş hücre boşlukları gibi belirgin değişiklikler görülmektedir. Miyokardiyal iskemi sonrası gelişen akut böbrek hasarının değerlendirildiği bir çalışmada, miyositlerdeki kısalmış ve dalgalanmış yapının koagülatif nekrozun ve nötrofil varlığının da enflamasyonun göstergesi olduğu bildirilmiştir (Mercanoğlu ve ark., 2018). İntestinal iskemi (75 dakika) sonrası epitel onarımının incelendiği bir çalışmada, 3, 24 veya 48 saatlik reperfüzyondan sonra jejunum dokusunda, 3 saatlik reperfüzyondan sonra hasar görmüş villuslar gözlenirken, 24 saatlik reperfüzyondan sonra kriptalarda genişlemiş hücreler arası boşluklar, düzensiz çekirdekler ve Paneth hücrelerinin kaybı, 48 saatlik reperfüzyon sonunda epitel dokusunda iyileşmenin meydana geldiği bildirilmiştir (Ikenoue ve ark., 2024). Retinal iskemi-reperfüzyon hasarında Müller hücrelerinde İndüklenen Heme Oksijenaz-1'in etkileri incelendiğinde 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saatlik reperfüzyon sonrası, iç retina ödemi ve birçok inflamatuvar hücrenin invazyonu gözlenmiştir (Arai-Gaun ve ark., 2004).

Serebral iskemi çalışmalarında histolojik incelemeler, doku hasarının mikroskobik düzeyde değerlendirilmesi ve tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Serebral iskemi-reperfüzyon hasarına karşı baicalin lipozomlarının koruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada 2 saatlik iskemi ve 12 saatlik reperfüzyondan sonra, serebral kortekste piramidal nöronlarda Nissl boyanmanın ve Nissl cisimciklerinin yoğunluğunun azaldığı, hipokampus bölgesinde ise vakuolleşme ile hücre dejenerasyonunun belirgin şekilde ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Long ve ark., 2022). Orta serebral arter oklüzyonu modelinde 20, 60 veya 90 dakikalık iskemi sonrası iskemik alanlarda nükleer piknotik değişikliklerle karakterize hücre ölümü nötrofil göçü ve makrofaj/mikroglia sayısında artış gözlenirken bu değişikliklerin reperfüzyona geçiş süresiyle ters orantılı olduğu gözlemlenmiştir (Tanaka ve ark., 2020). Serebral iskemi (30 ve 60 dakikalık) uygulanan sıçanlardan belirli bir düzende sıralanan hipokampal nöronların reperfüzyon sonrası hipokampal CA1 bölgesinde artan hücreler arası mesafe ve nöron kaybı ile karakterize düzensiz morfoloji gözlemlendiği bildirilmiştir (Çeliközlü ve ark., 2023; Demirci ve ark., 2020).

Beyinde astrositlerin serebral iskemi sırasında reaktif hale geçtiği, GFAP vimentin benzeri proteinlerin arttığı gözlenmektedir (Akbulut ve ark., 2023; G. Liang ve ark., 2015; R. Liu ve ark., 2024b; Uzar ve ark., 2011). Serebral iskemi sırasında beyinde önemli işlevlere sahip

BDNF proteininin azaldığı, buna bağlı olarak da nöronal hasara karşı hassasiyetin artışı ve iyileşmeyi yavaşlatma etkisi olduğu düşünülmektedir (Markowska ve Tarnacka, 2024; Treble-Barna ve ark., 2024; You ve ark., 2024a). Glutamat-eksitotoksik hasarın değerlendirildiği 90 dakikalık bir iskemi modelinde normal boyutlu az sayıda ve kısa uzantılara sahip astrositlerin aktif hale geçerek artmış uzantı sayısı ve kalınlaşmış uzantılarla karakterize olduğu ve aynı zamanda anlamlı oranda artmış TUNEL pozitif hücre gözlenmiştir (Chen ve ark., 2024). Serebral iskemi modelinde eksozom tedavi etkinliği değerlendirildiğinde iskemi/reperfüzyon kaynaklı artan astrogliozisin hafiflediği bildirilmiştir (Deng ve ark., 2024). You ve ark., (2024b) Salidroside türevi SHPL-49'un serebral iskemi modeline etkilerini değerlendirdiğinde, dolaylı yoldan indüklenen BDNF'in dejenerasyona uğrayan nöron sayısını azalttığı ve serebral iskemi grubu hayvanlarda nörojenezi hızlandığı bildirilmiştir. Min ve ark., (2024) serebral iskemiye bağlı intestinal piroptoz üzerine yaptıkları bir araştırmada, iskemi/reperfüzyonun indüklediği apoptozun, uygulanan tedavi ajanı ve yönteminin apoptozun erken evrelerine müdahale ederek bu süreci hafifletebileceğini bildirmiştir. Bu bulgular, iskemik hasarın nöronal yapılar üzerindeki olumsuz etkilerini ve reperfüzyon sürecinin bu hasarı nasıl modüle edebileceğini göstermekte olup bu tür histolojik ve immünohistokimyasal değişikliklerin detaylı incelenmesi, iskemik hasarın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve potansiyel terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Literatürle uyumlu olarak serebral iskemi modeli uyguladığımız deney hayvanlarında bozulmuş morfolojik yapı, indüklenmiş apoptoz, aktif astrogliozis, azalmış BDNF immünreaktivitesi gözlemledik. Uyguladığımız PNX-14 tedavisi ile bozulmuş morfolojik yapının önemli ölçüde düzeldiğini, astrogliozisin anlamlı ölçüde hafiflediğini, nöronal apoptozun azaldığını ve BDNF immünreaktivitesinin arttığını gözlemledik. Tüm bu etkilerin nöral onarım mekanizmalarında kritik öneme sahip, oksidatif stresi azaltmaya, apoptozu hafifletmeye katkıda bulunan PNX-14'ün nöronal koruyucu etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Başlangıçta üreme üzerinde rolü tanımlanan PNX-14'ün merkezi sinir sistemi ve periferik dokularda çok çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen bir nöropeptit olduğu bildirilmiştir. Üreme sisteminde luteinize edici hormon (LH) salgısını artırarak ovulasyonu ve oosit olgunlaşmasını desteklemektedir (Billert ve ark., 2020; Liang ve ark., 2022). Farklı olarak deneysel modellerde, amiloid-beta birikimi ve skopolamin kaynaklı hafıza bozukluklarını hafifleterek hafıza süreçlerinde önemli olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Liu ve ark., 2019). GnRH reseptörlerini hedef alarak anksiyete semptomlarını azalttığı gösterilerek anksiyolitik etkileri

kanıtlanmıştır (Stein ve ark., 2016). Bu etkilerin yanı sıra, stres yanıtlarında rol aldığı ve kortizol gibi stres hormonları ile etkileşim içinde olduğu gözlemlenmiştir (Friedrich ve Stengel, 2021b). Enerji metabolizması ve pankreatik adacık fonksiyonları üzerindeki etkileri ile metabolik süreçlere de katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Prinz ve ark., 2017). Bir diğer metabolik etkisi ise icv PNX-14 uygulanmasının beslenme davranışını etkilemesidir (Schalla ve ark., 2017b). Ayrıca mezenterik iskemi kaynaklı gastrointestinal hasara karşı koruyucu etkisi de bildirilmiştir. Vasküler düz kaslarda proliferasyonu ve apoptozu regüle etmesi de önemli fizyolojik etkileri arasında görülmektedir. Sepsis ile indüklenen kardiyopulmoner hasarın değerlendirildiği bir çalışmada PNX-14'ün hasar üzerine hafifletme etkisi olduğu görülmüştür (Ling ve ark., 2021b; Özdemir Kumral ve ark., 2022; Schalla ve ark., 2017b; Şen ve ark., 2023). Tüm bu bulgular, PNX-14'ün nörodejeneratif hastalıklar, anksiyete bozuklukları ve metabolik sendrom gibi klinik durumların tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular PNX-14'ü üreme bozuklukları, nörodejenerasyon, anksiyete ve metabolik hastalıklar gibi durumlarda ele almak için umut verici bir hedef olarak konumlandırmaktadır.

PNX-14'ün, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nitrik oksit (NO) koruyucu faktörlerin ekspresyonunu desteklerken ROT'un ve NADPH oksidaz 1 (NOX1) üretimini azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak, PNX-14'ün, iskemik beyin hasarında inflamatuvar yanıtın başlatılmasında çok önemli bir rol oynayan yüksek mobilite grubu 1 (HMGB1) proteininin ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Rocca ve ark., 2018; Yosten ve ark., 2013). Mikroglialın klasik M1 fenotipinden alternatif M2 fenotipine dönüşümünün nöroinflamasyon sürecinde hem zarar verici hem de immüno-supresif etkiler gösterebildiği ortaya konmuştur. Güncel çalışmalar, mikroglial polarizasyonun M2 fazına kaymasının beyin iskemik hasarında faydalı bir fenotip oluşturabileceğini öne sürmektedir. Phoenixin-20 nöropeptidinin iskemik inme modelinde mikroglia M2 polarizasyonunu indükleyerek beyin enfarktüsünü iyileştirdiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2022). Son zamanlarda araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen PNX-14'ün nöroprotektif etki başta olmak üzere koruma etkisi özellikle iskemi-reperfüzyon hasarında kendini göstermektedir.

Daha önce orta serebral arter oklüzyonu iskemik sıçan modelinde icv uygulama ile ön tedavi olarak ve oksijen-glikoz yoksunluğu ve reoksijenasyon modelinde tedavi edici ajan olarak kullanılan PNX-14 (Ma ve ark., 2020; B. Zhang ve Li, 2020b), ilk kez çalışmamızda global serebral iskemi sıçan modelinde cilt altı yolla uygulanmıştır. Böylelikle, literatürde belirtildiği

gibi (Rocca ve ark., 2018b) PNX-14'ün kan beyin bariyerini geçebilme potansiyeli desteklenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda literatüre uyumlu olarak PNX-14'ün oksidatif hasarı azaltıp reaktif oksijen türleri oluşumunu engelleyerek, apoptozu ve astrogliozisi azaltarak serebral iskemi kaynaklı nöronal hasarı azalttığı ve nöroprotektif etki sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

- Abdul-Sabour Ahmed Bader, A. (2023). Black cumin (*Nigella sativa*) to treat bronchial asthma, ischemia, and cardiovascular diseases. İçinde *Biochemistry, Nutrition, and Therapeutics of Black Cumin Seed* (ss. 231-236). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90788-0.00018-4>
- Acar Arslan, E. (2019). The Effects of Edaravone on Experimental Brain Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital Medical Journal*. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2019.15013>
- Akbulut, N. H., Topal, G., & Eyigör, Ö. (2023). İskemik Beyin Hasarında Reaktif Astrositlerin Fonksiyonları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 49(1), 133-143. <https://doi.org/10.32708/UUTFD.1261257>
- Akçay, G. (2021). Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan serebral iskemi modeli. *Turkish Bulletin of Hygiene*.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=03779777&AN=151231347&h=0sSrriFvAf3p2CYPiITjMfE%2BJooMHs0dcZII%2FC%2Fvzgfffxu08qVjcgJi3BbCVLAFsZSZCfR9XAxwQbyOb%2FCXTA%3D%3D&crl=c>
- Allen, C. L., & Bayraktutan, U. (2009). Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, 4(6), 461-470. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x>
- Althausen, S., Mengesdorf, T., Mies, G., Oláh, L., Nairn, A. C., Proud, C. G., & Paschen, W. (2001). Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of neurochemistry*, 78(4), 779-787. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00462.X>
- Arai-Gaun, S., Katai, N., Kikuchi, T., Kurokawa, T., Ohta, K., & Yoshimura, N. (2004). Heme Oxygenase-1 Induced in Müller Cells Plays a Protective Role in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(11), 4226. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0450>
- Balkan, S. (2009). *Serebrovasküler hastalıklar* (3th bs). Güneş Tıp Kitabevleri.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17(3), 472-476.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.17.3.472>

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W. H. Freeman, Ed.; 5th bs).
- Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 8378, 21(21), 8378. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218378>
- Bonaventura, A., Liberale, L., Vecchié, A., Casula, M., Carbone, F., Dallegri, F., & Montecucco, F. (2016). Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1967. <https://doi.org/10.3390/ijms17121967>
- Callaway, J. K., Knight, M. J., Watkins, D. J., Beart, P. M., Jarrott, B., & Delaney, P. M. (2000). A novel, rapid, computerised method for quantitation of neuronal damage in a rat model of stroke. *Journal of Neuroscience Methods*, 102(1), 53-60. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00278-8)
- Chehaibi, K., Trabelsi, I., Mahdouani, K., & Slimane, M. N. (2016). Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25(11), 2585-2593. <https://doi.org/10.1016/J.JSTROKECEREBROVASDIS.2016.06.042>
- Chen, J., Liu, C., Li, L., Tao, W. T., Zhang, X., Zhao, S., Wang, C., & Huang, L. (2024). Exogenous leptin alleviates glutamate-excitotoxic injury caused by cerebral ischemia–reperfusion in mice by affecting the expression of glutamate transporters. *Brain Research*, 1845, 149201. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2024.149201>
- Christophe, M., & Nicolas, S. (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Current pharmaceutical design*, 12(6), 739-757. <https://doi.org/10.2174/138161206775474242>
- Cimarosti, H., & Henley, J. M. (2008). Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 14(6), 626-636. <https://doi.org/10.1177/1073858408322677>
- Cleveland, K. (2018). *Neuropeptides and the Brain. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*.
- Coleman, E. R., Moudgal, R., Lang, K., Hyacinth, H. I., Awosika, O. O., Kissela, B. M., & Feng, W. (2017). Early Rehabilitation After Stroke: a Narrative Review. *Current atherosclerosis reports*, 19(12). <https://doi.org/10.1007/S11883-017-0686-6>
- Cruces, R., Muñoz-García, I., Palmer-Cancel, S. J., & Salas, C. (2022). A Neuropsychological Rehabilitation Framework to Address Cognitive and

- Neurobehavioral Impairments After Strokes to the Anterior Communicating Artery. *Frontiers in Human Neuroscience*, *16*, 808011. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2022.808011/BIBTEX>
- Culpan, Y., Ozden, L., Gozderesi, Y., Kocak, B., Baltaci, Z. H., Denizli, A., Karademir Yilmaz, B., & Gulhan, R. (2024). Effect of methylglyoxal on Parkinson's disease pathophysiology in the rotenone model. *Marmara Medical Journal*, *37*(2), 166-177. <https://doi.org/10.5472/MARUMJ.1480086>
- Çeliközlü, S., Özyiğit, F., Altıkat, S., Köktürk, S., & Çeliközlü, H. (2023). Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarında Hesperidin Nöroprotektif Etkisi. *Sakarya Tıp Dergisi*, *13*(2), 265-276. <https://doi.org/10.31832/SMJ.1182213>
- Dawson, V. L., Kizushi, V. M., Huang, P. L., Snyder, S. H., & Dawson, T. M. (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *16*(8), 2479-2487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02479.1996>
- de Groot, H., & Rauen, U. (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation proceedings*, *39*(2), 481-484. <https://doi.org/10.1016/J.TRANSProceed.2006.12.012>
- Delcour, M., Russier, M., Xin, D. L., Massicotte, V. S., Barbe, M. F., & Coq, J. (2011). Mild musculoskeletal and locomotor alterations in adult rats with white matter injury following prenatal ischemia. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *29*(6), 593-607. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.02.010>
- Demirci, T., Bilge, N. B., Abuç, Ö. Ö., & Karaavcı, N. Ç. (2020). 2-Aminoetoksidifenil Borat' ın Akut Serebral İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkisi; Deneysel Bir Çalışma. *Sakarya Tıp Dergisi*, *10*(1), 74-81. <https://doi.org/10.31832/SMJ.637779>
- Deng, M., Hou, Y., Liu, J., He, J., Lan, Z., & Xiao, H. (2024). Mesenchymal stem cell-derived exosomes overexpressing SRC-3 protect mice from cerebral ischemia by inhibiting ferroptosis. *Brain Research Bulletin*, *211*, 110948. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2024.110948>
- Eroschenko, V., & Fiore, M. Di. (2013). *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. [https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=sH87M12QswcC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Victor+P.+Eroschenko,+2007,+diFIORE%E2%80%99S+ATLAS+OF+HISTOLOGY+WITH+FUNCTIONAL+CORRELATIONS+\(11th+ed.\)&ots=zSa0QRqhgl&sig=uGlmzWZGbmKvK1OtWkzznE7y-eE](https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=sH87M12QswcC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Victor+P.+Eroschenko,+2007,+diFIORE%E2%80%99S+ATLAS+OF+HISTOLOGY+WITH+FUNCTIONAL+CORRELATIONS+(11th+ed.)&ots=zSa0QRqhgl&sig=uGlmzWZGbmKvK1OtWkzznE7y-eE)

- Fang, I.-M., Yang, C.-M., Yang, C.-H., Chiou, S.-H., & Chen, M.-S. (2013). Transplantation of induced pluripotent stem cells without C-Myc attenuates retinal ischemia and reperfusion injury in rats. *Experimental Eye Research*, *113*, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.05.007>
- Finkel, T. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*. <https://www.nature.com/articles/35041687>
- Friedrich, T., Schalla, M. A., Lommel, R., Goebel-Stengel, M., Kobelt, P., Rose, M., & Stengel, A. (2020). Restraint stress increases the expression of phoenixin immunoreactivity in rat brain nuclei. *Brain Research*, *1743*, 146904. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146904>
- Friedrich, T., & Stengel, A. (2021a). Role of the Novel Peptide Phoenixin in Stress Response and Possible Interactions with Nesfatin-1. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9156. <https://doi.org/10.3390/ijms22179156>
- Friedrich, T., & Stengel, A. (2021b). Role of the Novel Peptide Phoenixin in Stress Response and Possible Interactions with Nesfatin-1. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 9156*, *22*(17), 9156. <https://doi.org/10.3390/IJMS22179156>
- Ganz, P., Amarenco, P., Goldstein, L. B., Silleisen, H., Bao, W., Preston, G. M., & Welch, K. M. A. (2017). Association of osteopontin, neopterin, and myeloperoxidase with stroke risk in patients with prior stroke or transient ischemic attacks results of an analysis of 13 biomarkers from the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels trial. *Stroke*, *48*(12), 3223-3231. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017965/SUPPL_FILE/STR_STROKE-2017-017965_SUPP2.PDF
- Gartner, L. P. ., & Hiatt, J. L. . (2007). *Color textbook of histology*. 573.
- Genc, C., Tahta, A., Erdag, E., Dolas, I., Sahin, S., Karaoz, E., Aras, Y., & Sabanci, P. A. (2023). Human-derived hair follicle stem cells and hydrogen sulfide on focal cerebral ischemia model: A comparative evaluation of radiologic, neurobehavioral and immunohistochemical results. *Brain Research*, *1799*, 148170. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2022.148170>
- Goldberg, M. P., & Choi, D. W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *13*(8), 3510-3524. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03510.1993>

- Gould, D. J. (2025). *BRS Neuroanatomy, 7e*. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- GUAN, Y., ZHANG, T., YU, J., LIU, J., LI, W., ZHENG, Y., WANG, J., LIU, Y., & ZHAI, F. (2023). Ginsenoside Rg1 protects against ischemia-induced neuron damage by regulating the rno-miRNA-27a-3p/PPAR γ axis. *BIOCELL*, 47(7), 1583-1594. <https://doi.org/10.32604/biocell.2023.028016>
- Gundlach, A. L., & Hargreaves, K. M. (2011). *Neuropeptides and their receptors: Targeting pain and other conditions.: C. 10(8)*. Nature Reviews Drug Discovery.
- Gupta, Y., Pharmacol, S. B.-I. J. P., & 2004, undefined. (2004). Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *researchgate.netYK Gupta, S BriyalIndian J Physiol Pharmacol, 2004•researchgate.net, 48(4), 379-394.* https://www.researchgate.net/profile/Seema-Briyal/publication/7834638_Animal_models_of_cerebral_ischemia_for_evaluation_of_drugs/links/5646409008ae54697fb9e4ef/Animal-models-of-cerebral-ischemia-for-evaluation-of-drugs.pdf
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free radicals in biology and medicine.* [https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=3DIKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Halliwell,+B.,+%26+Gutteridge,+J.+M.+C.+\(2015\).+Free+Radicals+in+Biology+and+Medicine.+Oxford+University+Press.&ots=bqjJ4YAviZ&sig=7nfla4MC TvRzEI0ExcmjQot6M4I](https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=3DIKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Halliwell,+B.,+%26+Gutteridge,+J.+M.+C.+(2015).+Free+Radicals+in+Biology+and+Medicine.+Oxford+University+Press.&ots=bqjJ4YAviZ&sig=7nfla4MC TvRzEI0ExcmjQot6M4I)
- Hongling, M., Daoqing, S., Qingdong, W., Zonglei, C., Qiushi, Z., Weibin, H., & Wei, W. (2020). Phoenixin 14 inhibits ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in microglia. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689, 108411. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108411>
- Hossmann, K. A. (2008). Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*, 55(3), 257-270. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2007.12.004>
- Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.-Q. D., Sergeev, V., Ubink, R., & Diez, M. (2000). Neuropeptides — an overview. *Neuropharmacology*, 39(8), 1337-1356. https://www.academia.edu/13651098/Neuropeptides_an_overview
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*, 66(3), 232-245. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.12.028>
- Hurn, P. D., Bhardwaj, A., & Traystman, R. J. (2002). *Cerebral Ischemia: Pathophysiology and Neuroprotection.* 339-347. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56107-8_24

- Iadecola, C., & Alexander, M. (2001). Cerebral ischemia and inflammation. *Current opinion in neurology*, 14(1), 89-94. <https://doi.org/10.1097/00019052-200102000-00014>
- Ikenoue, M., Chojjookhuu, N., Yano, K., Fidya, Takahashi, N., Ishizuka, T., Shirouzu, S., Yamaguma, Y., Kai, K., Higuchi, K., Sawaguchi, A., Nanashima, A., & Hishikawa, Y. (2024). The crucial role of SETDB1 in structural and functional transformation of epithelial cells during regeneration after intestinal ischemia reperfusion injury. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(4), 325-336. <https://doi.org/10.1007/s00418-023-02263-9>
- Kalogeris, T., Baines, C., & Krenz, M. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123943095000067>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*, 298, 229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of Neural Science* (McGraw-Hill, Ed.; 5th bs).
- Kaya, D., & Özdemir, Y. (2011). *Serebral Kan Akımı ve Metabolizması, Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları*. (Emre KUMRAL, Ed.; 2th bs). GÜNEŞ KİTAP EVLERİ.
- Kuklina, E. V., Tong, X., George, M. G., & Bansil, P. (2012). Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective. *Expert review of neurotherapeutics*, 12(2), 199-208. <https://doi.org/10.1586/ERN.11.99>
- Kulinska, K. I., Andrusiewicz, M., Dera-Szymanowska, A., Billert, M., Skrzypski, M., Szymanowski, K., Nowak-Markwitz, E., Kotwicka, M., & Wołuń-Cholewa, M. (2021). Phoenixin as a New Target in the Development of Strategies for Endometriosis Diagnosis and Treatment. *Biomedicines 2021, Vol. 9, Page 1427*, 9(10), 1427. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9101427>
- Langhorne, P., Bernhardt, J., & Kwakkel, G. (2011). Stroke rehabilitation. *The Lancet*, 377(9778), 1693-1702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60325-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60325-5)
- Li, C.-W., Li, L.-L., Chen, S., Zhang, J.-X., & Lu, W.-L. (2020). Antioxidant Nanotherapies for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00200>
- Liang, G., Shi, B., Luo, W., & Yang, J. (2015). The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and brain functions : BBF*, 11, 18. <https://doi.org/10.1186/s12993-015-0064-x>

- Liang, H., Zhao, Q., Lv, S., & Ji, X. (2022). Regulation and physiological functions of phoenixin. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*, 956500. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.956500/BIBTEX>
- Ling, C., Hu, X., Luo, L., Liang, C., Wang, H., & Chen, C. (2021a). Phoenixin-14 regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by modulation of KCNQ1OT1/miR-183-3p/CTNNB1 axis. *Environmental toxicology and pharmacology*, *86*. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103655>
- Ling, C., Hu, X., Luo, L., Liang, C., Wang, H., & Chen, C. (2021b). Phoenixin-14 regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by modulation of KCNQ1OT1/miR-183-3p/CTNNB1 axis. *Environmental toxicology and pharmacology*, *86*. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103655>
- Liu, P., Xie, Y., Meng, X.-Y., & Kang, J.-S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, R., Chen, Y., Zhang, X., Cai, Y., Xu, S., Xu, Q., Li, X., Li, W., Liu, P., & Liu, W. (2024a). Pharmacological efficacy study of the cardio-cerebral stasis transforming medicines on cerebral ischemia and myocardial infarction in rats. *Heliyon*, *10*(20), e39162. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39162>
- Liu, R., Chen, Y., Zhang, X., Cai, Y., Xu, S., Xu, Q., Li, X., Li, W., Liu, P., & Liu, W. (2024b). Pharmacological efficacy study of the cardio-cerebral stasis transforming medicines on cerebral ischemia and myocardial infarction in rats. *Heliyon*, *10*(20), e39162. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E39162>
- Liu, W., Yang, W., Niu, R., Cong, L., Jiang, M., & Bai, G. (2023). Costunolide covalently targets and inhibits CaMKII phosphorylation to reduce ischemia-associated brain damage. *Phytomedicine*, *115*, 154822. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154822>
- Long, Y., Xiang, Y., Liu, S., Zhang, Y., Wan, J., Ci, Z., Cui, M., Shen, L., Li, N., & Guan, Y. (2022). Macrophage membrane modified baicalin liposomes improve brain targeting for alleviating cerebral ischemia reperfusion injury. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *43*, 102547. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102547>
- Lu, H., Liu, X., Zhang, N., Zhu, X., Liang, H., Sun, L., & Cheng, Y. (2016). Neuroprotective Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Noggin-Modified Bone Mesenchymal Stem Cells in Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *25*(2), 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.10.013>

- Luiz Carlos Junqueira, B., & Carneiro, J. (2007). Basic Histology. *Journal of Anatomy*, 211(3), 412. https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2007.771_1.X
- Ma, H., Su, D., Wang, Q., Chong, Z., Zhu, Q., He, W., & Wang, W. (2020). Phoenixin 14 inhibits ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in microglia. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689, 108411. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108411>
- Markowska, A., & Tarnacka, B. (2024). Molecular Changes in the Ischemic Brain as Non-Invasive Brain Stimulation Targets—TMS and tDCS Mechanisms, Therapeutic Challenges, and Combination Therapies. *Biomedicines*, 12(7), 1560. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071560>
- McIlwraith, E. K., Loganathan, N., & Belsham, D. D. (2019). Regulation of Gpr173 expression, a putative phoenixin receptor, by saturated fatty acid palmitate and endocrine-disrupting chemical bisphenol A through a p38-mediated mechanism in immortalized hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485, 54-60. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2019.01.026>
- Mercanoğlu, G., Önder, S. Y., Macit, Ç., & Mercanoğlu, F. (2018). The effect of nebivolol on acute renal injury developed after myocardial ischemia: A preclinical study. *Haseki Tip Bulteni*, 56(3), 228-234. <https://doi.org/10.4274/HASEKI.4358>
- Min, L., Fu, F., & Wang, T. (2024). Escin alleviates cerebral ischemia-induced intestinal pyroptosis via the GR-dependent p38 MAPK/NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome activation. *International Immunopharmacology*, 138, 112592. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2024.112592>
- Mohr, J. P., Grotta, J. C., Mayberg, M. R., Moskowitz, M., von Kummer, R., & Wolf, P. A. (2011). Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 1-1485. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-40556-7>
- Narantuya, D., Nagai, A., Sheikh, A. Md., Masuda, J., Kobayashi, S., Yamaguchi, S., & Kim, S. U. (2010). Human Microglia Transplanted in Rat Focal Ischemia Brain Induce Neuroprotection and Behavioral Improvement. *PLoS ONE*, 5(7), e11746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011746>
- Ogan, A. (2003). *Batın içi sepsis metilprednizolonun kan-beyin bariyeri geçirgenlik artışı ve nörolojik değerlendirme üzerine etkisi. thesis, istanbul university school of medicine department of anesthesiology and reanimation.* Istanbul University School of Medicine .
- Oğul, E. (2002). *Klinik Nöroloji* (1st bs). Nobel ve Güneş Kitapevi.

- Opping-Gyebi, A., Metzger, D., Vann, P. H., Sumien, N., & Schreihof, D. A. (2022). Dietary genistein and 17 β -estradiol implants differentially influence locomotor and cognitive functions following transient focal ischemia in middle-aged ovariectomized rats at different lengths of estrogen deprivation. *Hormones and Behavior*, 144, 105201. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2022.105201>
- Ozdemir-Kumral, Z. N., Akgün, T., Haşim, C., Ulusoy, E., Kalpakçioğlu, M. K., Yüksel, M. F., Okumuş, T., Us, Z., Akakin, D., Yüksel, M., Gören, Z., & Yeğen, B. (2024). Intracerebroventricular administration of the exercise hormone irisin or acute strenuous exercise alleviates epileptic seizure-induced neuroinflammation and improves memory dysfunction in rats. *BMC Neuroscience*, 25(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S12868-024-00884-X/FIGURES/7>
- Özbeyli, D., ÇİLİNGİR KAYA, Ö. T., AYKAÇ, A., AYDEMİR, S., GÜRLER, E. B., & YÜKSEL, M. (2020). Seruleinle Oluşturulmuş Sıçan Akut Pankreatit Modelinde Beta Glukan ve Fukoksantin Etkisi. *Bozok Tıp Dergisi*. <https://doi.org/10.16919/bozoktip.710744>
- Özdemir Kumral, Z. N., Sen, L. S., Ozturk, C. C. , UPRAK, T. K., & YEGEN, B. (2022). *Phoenixin-14 Alleviates Sepsis-Induced Cardiopulmonary Damage: Role of the Vagal Tone*. 50-51.
- Özgül, C., & Nazıroğlu, M. (2011). Nörolojik Hücrelerde TRPM2 Katyon Kanallarının Moleküler Mekanizmalardaki Rollerini. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 27(4), 144-151. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/omujecm/issue/20416/216945>
- Pantazi, E., Bejaoui, M., Folch-Puy, E., Adam, R., & Roselló-Catafau, J. (2016). Advances in treatment strategies for ischemia reperfusion injury. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 17(2), 169-179. <https://doi.org/10.1517/14656566.2016.1115015>
- Paxinos, G., Watson, C., Diego, S., Boston, L., & York, N. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. [https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=0prYfdDbh58C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Paxinos,+G.,+%26+Watson,+C.+\(2006\).+%22The+Rat+Brain+in+Stereotaxic+Coordinates%22+\(6th+ed.\).+Academic+Press.&ots=-aewC__HBg&sig=XS_KVApdkAgDhAvFbq8TyJ0TKys](https://www.google.com/books?hl=tr&lr=&id=0prYfdDbh58C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Paxinos,+G.,+%26+Watson,+C.+(2006).+%22The+Rat+Brain+in+Stereotaxic+Coordinates%22+(6th+ed.).+Academic+Press.&ots=-aewC__HBg&sig=XS_KVApdkAgDhAvFbq8TyJ0TKys)
- Prinz, P., Scharner, S., Friedrich, T., Schalla, M., Goebel-Stengel, M., Rose, M., & Stengel, A. (2017). Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 195-201. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.09.048>

- Pulsinelli, W. A., & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, *10*(3), 267-272.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.10.3.267>
- Rocca, C., Scavello, F., Granieri, M. C., Pasqua, T., Amodio, N., Imbrogno, S., Gattuso, A., Mazza, R., Cerra, M. C., & Angelone, T. (2018a). Phoenixin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *75*(4), 743-756.
<https://doi.org/10.1007/S00018-017-2661-3>
- Rocca, C., Scavello, F., Granieri, M. C., Pasqua, T., Amodio, N., Imbrogno, S., Gattuso, A., Mazza, R., Cerra, M. C., & Angelone, T. (2018b). Phoenixin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *75*(4), 743-756.
<https://doi.org/10.1007/S00018-017-2661-3>
- Roome, R. B., & Vanderluit, J. L. (2015). Paw-Dragging: a Novel, Sensitive Analysis of the Mouse Cylinder Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *2015*(98), 52701. <https://doi.org/10.3791/52701>
- Ross, M., & Pawlina, W. (2010). *Histology A text and atlas With correlated cell and molecular biology* (6. bs). Lip pincott Williams & Wilkins.
<https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=933254>
- Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., Rose, M., & Stengel, A. (2017a). Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, *96*, 53-60.
<https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2017.08.004>
- Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., Rose, M., & Stengel, A. (2017b). Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, *96*, 53-60.
<https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2017.08.004>
- Schalla, M., & Stengel, A. (2018). Phoenixin—A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1726.
<https://doi.org/10.3390/IJMS19061726>
- Shaik, N. F., Regan, R. F., & Naik, U. P. (2021). Platelets as drivers of ischemia/reperfusion injury after stroke. *Blood Advances*, *5*(5), 1576-1584.
<https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020002888>
- Sharma, D., Kumar, K., & Bisht, G. S. (2022). A Mini-Review on Potential of Neuropeptides as Future Therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *28*(1). <https://doi.org/10.1007/S10989-021-10309-6>

- Shen, H., & Wang, Y. (2010). Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(2), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.008>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231716303196>
- Sims, N. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443909002142>
- Standring, S., Ellis, H., ... J. H.-A. journal, & 2005, undefined. (2005). Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. *Am Soc Neuroradiology* Standring, H Ellis, J Healy, D Johnson, A Williams, P Collins, C Wigley *American journal of neuroradiology*, 2005•*Am Soc Neuroradiology*, 169. <https://www.ajnr.org/content/26/10/2703.short>
- Stein, L. M., Tullock, C. W., Mathews, S. K., Garcia-Galiano, D., Elias, C. F., Samson, W. K., & Yosten, G. L. C. (2016). Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor *Gpr173*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(3), R489-R496. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00191.2016>
- Stoodley, M. A., Macdonald, R. L., & Weir, B. K. A. (1998). Surgical Treatment of Middle Cerebral Artery Aneurysms. *Neurosurgery Clinics of North America*, 9(4), 823-834. [https://doi.org/10.1016/S1042-3680\(18\)30231-6](https://doi.org/10.1016/S1042-3680(18)30231-6)
- Swanson, R., Ying, W., & Kauppinen, T. (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*, 4(2), 193-205. <https://doi.org/10.2174/1566524043479185>
- Szjártó, A., Turóczy, Z., Szabó, J., Kaliszky, P., Gyurkovics, E., Arányi, P., Regáli, L., Harsányi, L., & Lotz, G. (2013). Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb. *Cardiovascular Pathology*, 22(6), 493-500. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.02.006>
- Şahan, M., Satar, S., & Koç, A. (2010). İskemik inme ve akut faz reaktanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19, 85. <https://dergipark.org.tr/en/pub/aktd/issue/2220/29430>
- Şen, L. S., Kahraman Akkühah, M. M., Mermer, K. S., Akgün, T., Yüksel, M., Ercan, F., Yegen, B., & Yegen, Ş. C. (2023). *Investigation of the Possible Protective Effect of*

Phoenixin-14 on Small Intestine and Lung Damage Due to Mesenteric Ischemia in Rats. 32-33.

Şener, G., Tuğtepe, H., Yüksel, M., Çetinel, Ş., Gedik, N., & Yeğen, B. Ç. (2006). Resveratrol Improves Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Renal Injury in Rats. *Archives of Medical Research*, 37(7), 822-829.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.04.003>

Şener, T. E., Yüksel, M., Özyılmaz-Yay, N., Ercan, F., Akbal, C., Şimşek, F., & Şener, G. (2015). Apocynin attenuates testicular ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 50(8), 1382-1387.
<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.11.033>

Tanaka, Y., Nakagomi, N., Doe, N., Nakano-Doi, A., Sawano, T., Takagi, T., Matsuyama, T., Yoshimura, S., & Nakagomi, T. (2020). Early Reperfusion Following Ischemic Stroke Provides Beneficial Effects, Even After Lethal Ischemia with Mature Neural Cell Death. *Cells*, 9(6), 1374.
<https://doi.org/10.3390/cells9061374>

Toklu, H., Deniz, M., & Yüksel, M. (2009). PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AND AMLODIPINE AGAINST CEREBRAL ISCHEMIA/REPERFUSION-INDUCED OXIDATIVE BRAIN INJURY IN RATS. *Marmara Medical*.
https://www.academia.edu/download/70974111/THE_PROTECTIVE_EFFECT_OF_MELATONIN_AND_A20211002-4850-94ssaj.pdf

Traystman, R. J. (2003a). Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR journal*, 44(2), 85-95. <https://doi.org/10.1093/ILAR.44.2.85>

Traystman, R. J. (2003b). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85-95. <https://doi.org/10.1093/ilar.44.2.85>

Treble-Barna, A., Petersen, B. A., Stec, Z., Conley, Y. P., Fink, E. L., & Kochanek, P. M. (2024). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Pediatric Acquired Brain Injury and Recovery. *Biomolecules*, 14(2), 191. <https://doi.org/10.3390/biom14020191>

Uzar, E., Acar, A., Fırat, U., Evliyaoğlu, O., Alp, H., Tüfek, A., Yavuz, C., Demirtaş, S., & Taşdemir, N. (2011). Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Rat Cerebral Ischemia/Reperfusion Damage. *Turkish Journal of Neurology*, 17(3), 131-136.

Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental neuroscience*, 27(2-4), 81-86.
<https://doi.org/10.1159/000085978>

Verzár, Z., Szabados, S., Verzár, Z., & Szabados, S. (2011). Diagnosis, Screening and Treatment of Abdominal, Thoracoabdominal and Thoracic Aortic Aneurysms.

- İçinde R. T. Grundmann (Ed.), *Diagnosis, Screening and Treatment of Abdominal, Thoracoabdominal and Thoracic Aortic Aneurysms*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/17451>
- Vitt, J. R., Trillanes, M., & Hemphill, J. C. (2019). Management of blood pressure during and after recanalization therapy for acute ischemic stroke. *Frontiers in Neurology*, *10*(FEB), 419763.
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00138/BIBTEX>
- Wang, S., Liang, R., & Liu, H. (2022). Phoenixin-20 ameliorates brain infarction by promoting microglia M2 polarization in an ischemic stroke model. *Metabolic Brain Disease*, *37*(5), 1517-1526. <https://doi.org/10.1007/S11011-022-00950-5/FIGURES/7>
- Yosten, G. L. C., Lyu, R. M., Hsueh, A. J. W., Avsian-Kretchmer, O., Chang, J. K., Tullock, C. W., Dun, S. L., Dun, N., & Samson, W. K. (2013). A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of neuroendocrinology*, *25*(2), 206-215.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2012.02381.X>
- You, S., Ma, Z., Zhang, P., Xu, W., Zhan, C., Sang, N., Xu, J., Wang, F., & Zhang, J. (2024a). Neuroprotective effects of the salidroside derivative SHPL-49 via the BDNF/TrkB/Gap43 pathway in rats with cerebral ischemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *174*, 116460. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116460>
- You, S., Ma, Z., Zhang, P., Xu, W., Zhan, C., Sang, N., Xu, J., Wang, F., & Zhang, J. (2024b). Neuroprotective effects of the salidroside derivative SHPL-49 via the BDNF/TrkB/Gap43 pathway in rats with cerebral ischemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *174*, 116460. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2024.116460>
- Yuan, T., Sun, Z., Zhao, W., Wang, T., Zhang, J., & Niu, D. (2017). Phoenixin: A Newly Discovered Peptide with Multi-Functions. *Protein & Peptide Letters*, *24*(6).
<https://doi.org/10.2174/0929866524666170207154417>
- Zhang, B., & Li, J. (2020a). Phoenixin-14 protects human brain vascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced inflammation and permeability. *Archives of biochemistry and biophysics*, *682*.
<https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108275>
- Zhang, B., & Li, J. (2020b). Phoenixin-14 protects human brain vascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced inflammation and permeability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *682*, 108275. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108275>
- Zhang, H. (1999). Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases.

Cardiovascular Research, 44(1), 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00183-2)

Zilles, K., & Amunts, K. (2010). Centenary of Brodmann's map—
conception and fate. *Nature Reviews Neuroscience*.
<https://www.nature.com/articles/nrn277>