T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE SİLİMARİN VE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Merve SOLMAZ

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE SİLİMARİN VE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Merve SOLMAZ

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Bu araştırma, Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)

Koordinatörlüğü tarafından 2015-ÖYP-107 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

ÖNSÖZ

Doktora eğitim sürecimin her aşamasında ilgisini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile beni yönlendiren ve her yönüyle örnek aldığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a, her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL ile birlikte çalıştığımız süreçte kendisinden çok şey öğrendiğim ve yokluğunu her zaman hissedeceğimiz rahmetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YILMAZ'a,

Deney modelinin oluşturulması sürecinde desteklerini esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ ve Dr. Derviş DAŞDELEN'e, biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyeleri sayın hocalarım Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV ve Doç. Dr. Fikret AKYÜREK'e, tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı İzmir Bakırçay Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı ve Farmakoloji Ana Bilim Dalı Öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK'e,

Tez çalışmalarım sırasında bana her türlü kolaylığı gösteren Anabilim Dalımızdaki değerli meslektaşlarım araştırma görevlileri Seda ŞİMŞEK, Dr. Ümmügülsüm ÖNAL ve Dr. İlknur YILDIRIM ve laboratuvar süreçlerinde beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK ve Fatma BATIRBEK'e,

Çalışmamı maddi konularda destekleyen Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordünatörlüğü çalışanları ve deney hayvanları bakımı ve operasyonları sürecinde her türlü olanağı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına,

Ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları destekleyerek bana her konuda cesaret ve moral veren annem Mukaddes ÖZER ve babam Lütfi ÖZER ile kardeşlerim Semih Emre ÖZER ve Rumeysa ÖZER'e, bir ömür boyu elimi hiç bırakmasın istediğim sevgili eşim Ekrem SOLMAZ ve neşe kaynağım oğlum Kerim'e sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

ŞEKİLLER viii

TABLOLAR x

GRAFİKLER xii

1. GİRİŞ 1

1.1. Hücre Hasarı Mekanizmaları 3

1.1.1. Hipoksik Hücre Hasarı 4

1.1.2. Serbest Radikal Hasarı 5

1.1.3. Kalsiyum Homeostasında Bozulma 6

1.2. Hücre Ölümü Mekanizmaları 6

1.2.1. Nekroz 8

1.2.2. Apopitoz 8

1.3. Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarı 11

1.4. Serebral Vasküler Anatomi 12

1.4.1. Karotis sistemi 12

1.4.2. Vertebrobaziller sistem 12

1.4.3. Willis poligonu 12

1.4.4. Watershed alanlar 13

1.5. Deney Hayvanlarında Serebral İskemi-Reperfüzyon Modelleri 14

1.5.1. Global Serebral İskemi Modelleri 14

1.5.2. Fokal Serebral İskemi Modelleri 15

1.5.3. Ön Beyin İskemisi Modelleri 16

1.6. İskemik İnmede Tedavi 17

1.6.1. Birincil Koruma 18

1.6.2. Genel İnme Tedavisi 18

1.6.3. Özel İskemik İnme Tedavisi 18

1.6.4. Komplikasyonların Tedavisi ve Yoğun Bakım 19

1.6.5. İkincil Koruma 19

1.6.6. Rehabilitasyon 19
1.7. Deve Dikeni (Silybum Marianum) ve Silimarin 20
1.8. Çörek Otu (Nigella Sativa) ve Timokinon 23
1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarının Klinik Değerlendirilmesi 26
1.9.1. Nörolojik Muayene ve Toklu'nun Modifiye Nörolojik Muayenesi 26
1.9.2. Gliya Aktivasyonu ve GFAP 28
1.9.3. Apopitoz Belirteçleri; TUNEL metodu ve Kaspazlar 29
1.9.4. TAS, TOS ve OSI 32
1.9.5. Yeni Bir Belirteç Olarak Trimetilamin N oksit (TMAO) 33
2. GEREÇ VE YÖNTEM 35
2.1. Deney Hayvanları 35
2.2. Timokinon ve Silimarinin Hazırlanması 35
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Cerrahi Prosedür 36
2.4. Nörolojik Muayene Skorlaması 38
2.5. Doku ve Kanların Temini ve Saklanması 38
2.6. Histolojik Çalışmalar 41
2.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyama 41
2.6.2. Toluidine Blue Boyama 41
2.6.3. İmmünohistokimyasal Boyamalar 43
2.6.4. TUNEL Metodu 45
2.7. Biyokimyasal Çalışmalar 46
2.7.1. Serum Total Oksidan ve Antioksidan Seviye Ölçümü 46
2.7.2. Oksidatif Stres İndeksi 46
2.7.3. Trimetilamin *N*-oksit (TMAO) 46
2.8. İstatistiksel Analiz 47
3. BULGULAR 48
3.1. Nörolojik Muayene Sonuçları 50
3.2. Histolojik Bulgular 52
3.2.1. Hematoksilen& Eozin Sonuçları 52

3.2.2. Toluidin Blue Boyama Sonuçları 54
3.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular 57
3.2.4. TUNEL Sonuçları 75
3.3. Biyokimyasal Bulgular 81
3.3.1. TAS, TOS ve OSI Sonuçları 81
3.3.2. Trimetilamin N-Oksit (TMAO) Sonuçları 85
4. TARTIŞMA 87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 105
6. KAYNAKLAR 106
7. EKLER *115*
EK-A: Etik Kurul Kararı 115
EK-B: Turnitin Raporu 116
8. ÖZGEÇMİŞ 125

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF: Apopitoz İndükleyici Faktör

ALT: Serum Alanin Transaminaz

ADP: Adenozin Difosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

Bax: Bcl-2-ilişkili X proteini

BCCAO: Bilateral *a. carotis communis* oklüzyonu (bilateral common carotid artery occlusion)

Ca^{++}: Kalsiyum

CAT: Katalaz

DAPI: 4,6-diamidin-2'-fenil indol

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ELISA: Enzime Bağlı İmmunosorbent Tahlili (Enzyme Linked Immünosorbent Assay)

ER: Endoplazmik Retikulum

FITC: Floresan izotiyosiyanat

FMO3: Flavin içeren monooksijenaz-3

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GR: Glutatyon Redüktaz

GSH: Redükte Glutatyon

H&E: Hematoksilen & Eosin

ig: İntra gastrik

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

İ/R: İskemi-reperfüzyon

ip: İntraperitoneal

K^+: Potasyum

LD 50: %50 öldürücü konsantrasyon

LDH: Laktat dehidrojenaz

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low Dansity Lipoprotein)

LT: Lökotrienler

MCAO: *A. cerebri media* oklüzyonu (middle cerebral artery occlusion)

MDA: Malondialdehit

Na^+: Sodyum

Na^+/K^+/ATPaz: Sodyum/ potasyum/ adenozin trifosfataz

NO: Nitrik oksit

O_2: Oksijen

OSİ: Oksidatif stres indeksi

pH: Hidrojenin gücü

po: Per oral

ROS: Reaktif oksijen türleri

SİR: Silimarin koruyucu etki + iskemi-reperfüzyon grubu

SOD: Süper oksit dismutaz

STİR: Silimarin + timokinon koruyucu etki + iskemi-reperfüzyon grubu

TAS: Total antioksidan seviyesi

TB: Toluidin blue

TİR: Timokinon koruyucu etki + iskemi-reperfüzyon grubu

TMA: Trimetilamin

TMAO: Trimetilamin N oksit

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α

TOS: Total oksidan seviyesi

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dNTP ucu etiketleme

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. DSÖ dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri (DSÖ 2020). 1

Şekil 1.2. Hücre hasarı mekanizmaları (Porth ve ark 2015). 3

Şekil 1.3. Hücre hasar mekanizmaları; hipoksi/iskemi hasarı (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 4

Şekil 1.4. Hücre hasar mekanizmaları; serbest radikal hasarı (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 5

Şekil 1.5. Hücre hasarı mekanizmaları; Ca++ homeostazında bozulma (BioRender.com ile oluşturulmuştur)..... 7

Şekil 1.6. Hücre hasarı ve hücre ölümü mekanizmaları (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 7

Şekil 1.7. Apopitoz, kaspaz bağımlı yolaklar: TNF ve FAS ligand (ölüm reseptörleri) yolu (ekstrinsik yol) ve mitokondri yolu (intrinsik yol) (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 11

Şekil 1.8. Willis poligonu (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 13

Şekil 1.9. Deve dikeni (Silybum Marianum) (Resim Capri23auto tarafından Pixabay'a yüklendi). 21

Şekil 1.10. Silimarinin yapısal formülü (Biorender.com ile oluşturulmuştur). 22

Şekil 1.11. A: Nigella Sativa ve Nigella Domascena çizimleri (Köhler 1897) **B:** Nigella Sativa meyvesi ve tohumları (Culos 2015). 24

Şekil 1.12. Timokinon yapısal formülü (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 24

Şekil 1.13. TMAO yapısal formülü (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 34

Şekil 2.1. A: Silimarin, **B:** Timokinon, **C:** Silimarin + Timokinon. 35

Şekil 2.2. Deney gruplarının oluşturulması (BioRender.com ile oluşturulmuştur). .. 36

Şekil 2.3. A ve **B:** izole edilmiş A. Carotis Communis, **C:** İzotermik battaniye ile vücut ısısı korunan denekler, **D:** İnsizyonu 3 adet sütür ile kapatılmış denek..... 37

Şekil 2.4. Döndürme testi açı ölçümü için çizim. Sıçanlar kuyruklarından tutularak, 1 m yükseklikte asılı kalır ve ön ayakların fleksiyonu gözlemlenir (BioRender.com ile oluşturulmuştur). 39

Şekil 2.5. Tırmanma testi için eğimli ahşam platform düzeneği (75 x 15 x 1 cm) (BioRender.com ile oluşturulmuştur)..... 39

Şekil 3.1. Serebrum H&E görüntüleri frontal korteks moleküler tabaka, piramidal tabaka ve beyaz cevher görülmektedir. 53

Şekil 3.2. Serebrum TB görüntüleri frontal korteks moleküler tabaka, piramidal tabaka ve beyaz cevher görülmektedir. 55

Şekil 3.3. Serebellum H&E ve TB görüntüleri moleküler tabaka, granüler tabaka Purkinje hücreleri ve beyaz cevherleri görülmektedir. 56

Şekil 3.4. Serebrum frontal korteks dokusu anti-GFAP antikoru ile işaretlenmeleri. 59

Şekil 3.5. Serebellum moleküler tabaka, granüler tabaka ve beyaz cevher anti-GFAP antikor işaretlenmeleri. 62

Şekil 3.6. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor işaretlenmeleri. 65

Şekil 3.7. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor işaretlenmeleri. 68

Şekil 3.8. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor işaretlenmeleri. 71

Şekil 3.9. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor işaretlenmeleri. 74

Şekil 3.10. Serebrum frontal korteks TUNEL işaretlenmeleri. 77

Şekil 3.11. Serebellum TUNEL işaretlenmeleri. 80

TABLOLAR

Tablo 1.1. Longa'nın nörolojik skoru..... 27

Tablo 1.2. Bederson'ın nörolojik fonksiyon testi. 27

Tablo 1.3. Garcia'nın davranış puanı. 27

Tablo 2.1. Toklu'nun Modifiye Nörolojik Muayene Skoru..... 40

Tablo 2.2. Frozen kesitler için H&E protokolü. 42

Tablo 2.3. Frozen kesitler için TB protokolü. 42

Tablo 2.4. Konjuge anti-GFAP antikoru işaretleme protokolü. 43

Tablo 2.5. Anti kaspaz-3 işaretleme protokolü. 44

Tablo 2.6. TUNEL protokolü. 45

Tablo 3.1. Deney hayvanlarının ağırlıkları..... 48

Tablo 3.2. Deney hayvanlarının ağırlıkları Tukey's-Hsd sonuçları. 49

Tablo 3.3. Nörolojik muayene skorları..... 50

Tablo 3.4. Nörolojik muayene skorları Tamhane's-T2 testi sonuçları..... 51

Tablo 3.5. Serebrum frontal korteks anti-GFAP antikor sonuçları. 57

Tablo 3.6. Serebrum anti-GFAP antikor Tukey's Hsd sonuçları. 58

Tablo 3.7. Serebellum anti-GFAP antikor sonuçları. 60

Tablo 3.8. Serebellum anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları. 61

Tablo 3.9. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları. 63

Tablo 3.10. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları. 64

Tablo 3.11. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları. 66

Tablo 3.12. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları. 67

Tablo 3.13. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor sonuçları. 69

Tablo 3.14. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları. 70

Tablo 3.15. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor sonuçları..... 72

Tablo 3.16. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor Tukey's Hsd sonuçları.73

Tablo 3.17. Serebrum frontal korteks TUNEL sonuçları. 75

Tablo 3.18. Serebrum frontal korteks TUNEL Tamhane's-T2 sonuçları. 76

Tablo 3.19. Serebellum TUNEL sonuçları..... 78

Tablo 3.20. Serebellum TUNEL Tamhane's-T2 sonuçları. 79

Tablo 3.21. Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları..... 81

Tablo 3.22. Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları..... 83

Tablo 3.22. (Devam) Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları 84

Tablo 3.23. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) sonuçları. 85

Tablo 3.24. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) Tukey's Hsd sonuçları..... 86

Tablo 4.1. Serebral İ/R hasarında silimarinin etkilerini araştıran çalışmalar. 103

Tablo 4.2. Serebral iskemi-reperfüzyon hasarında silimarinin etkilerini araştıran çalışmalar……..104

GRAFİKLER

Grafik 3.1. Deney hayvanlarının ağırlıkları. 48

Grafik 3.2. Nörolojik muayene skorları. 50

Grafik 3.3. Serebrum frontal korteks anti-GFAP antikor sonuçları..... 57

Grafik 3.4. Serebellum anti-GFAP antikor sonuçları. 60

Grafik 3.5. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları..... 63

Grafik 3.6. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları..... 66

Grafik 3.7. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor sonuçları. 69

Grafik 3.8. Serebrum frontal korteks anti-Kaspaz 3 antikor sonuçları. 72

Grafik 3.9. Serebrum frontal korteks TUNEL sonuçları. 75

Grafik 3.10. Serebellum TUNEL sonuçları. 78

Grafik 3.11. Serum TAS ve TOS sonuçları. 82

Grafik 3.12. Serum OSI sonuçları..... 82

Grafik 3.13. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) sonuçları..... 85

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ratlarda Serebral İskemi-Reperfüzyon Modelinde Silimarin ve Timokinonun Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması

Merve SOLMAZ
Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2021

Serebrovasküler hastalıklar, dünya çapında morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Bu çalışmada, serebral iskemi reperfüzyon oluşturulmuş sıçanlarda antioksidan etkinliği bilinen silimarin ile timokinon ve ikisinin kombine kullanımının histomorfolojik ve biyokimyasal açıdan etkilerini araştırmayı amaçlamıştır.

Toplam 5 grupta 49 erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. 1-SHAM (n=7); 2-İskemi-reperfüzyon (REP) (n=12); 3-Silimarin (200 mg/kg) + İskemi-reperfüzyon (SİR) (n=9); 4-Timokinon (3 mg/kg) + İskemi-reperfüzyon (TİR) (n=11) 5-Silimarin (200 mg/kg) + Timokinon (3 mg/kg) + İskemi-reperfüzyon (STİR) (n=10). Etken maddeler 14 gün süreyle ip uygulandı. 14. gün sıçanlarda bilateral karotis arter ligasyonuyla 30 dakika iskemi oluşturuldu. Reperfüzyondan 24 saat sonra ötenazi uygulanarak doku örnekleri alındı.

Deneklerin nörolojik muayeneleri, genel histopatolojisi yanı sıra anti kaspaz-3 antikoru ve TUNEL yöntemiyle apopitoz, anti GFAP antikoruyla da astrosit aktivasyonu değerlendirildi. Serum örneklerinden toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS) seviyeleri, oksidatif stres indeksi (OSI) ve TMAO düzeyleri değerlendirildi.

Nörolojik muayenelerinin değerlendirilmesinde SHAM grubu en düşük, REP grubu en yüksek değerlere sahipti ($p=0.001$). SİR, TİR ve STİR gruplarının skorları REP grubundan düşük olmakla birlikte, aralarındaki fark anlamlı değildi.

Histopatolojik değerlendirmede: REP grubunda artmış dejenerasyon izlenirken, SİR, TİR ve STİR gruplarında bu dejenerasyonun azaldığı, apopitoz değerlendirmesinde REP grubunda TUNEL ve kaspaz-3 pozitif hücre oranı artarken, SİR, TİR ve STİR gruplarında REP grubuna göre anlamlı bir düşüş mevcuttu ($p<0,05$). Serebellum TUNEL değerlendirmesinde ise SHAM grubunun değerleri tüm gruplardan anlamı derecede düşükken ($p<0,05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. GFAP ifadesi REP grubu tüm gruplarda göre daha yüksek değerlere sahipken ($p<0,05$), diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

TAS değerlerinde SİR ve TİR grubunda REP grubuna göre anlamlı artış mevcutken ($p<0,05$), TOS ve OSI değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunamadı. SİR, TİR ve STİR gruplarında TMAO değerleri azalmış olmakla birlikte sadece STİR grubundaki azalma REP ve SHAM grubuna göre anlamlıydı ($p<0,05$).

Bu verilere göre, beyin iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu olarak silimarin ve timokinonun kullanılması, nörolojik defisiti, morfolojik parametreleri, apopitozu ve astrosit aktivasyonunu kısmen iyileştirse de kombine kullanımının ek fayda sağlamadığı, TAS değerlerinde artış görülse de bunun OSI değerlerine yansımadığı, TMAO seviyelerindeyse kombine kullanımının daha etkili olduğu değerlendirildi.

Anahtar Sözcükler: apopitoz; oksidatif stres; serebral iskemi-reperfüzyon; silimarin; timokinon

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Comparison of Protective Effects of Silymarin and Thymoquinone in the Cerebral Ischemia-Reperfusion Model in Rats

Merve SOLMAZ
Department of Histology and Embryology (Medicine)

PhD THESIS / KONYA-2021

Cerebrovascular diseases are an important cause of morbidity and mortality worldwide. This study aimed to investigate the histomorphological and biochemical effects of the combined use of silymarin and thymoquinone with known antioxidant effects in rats with cerebral ischemia-reperfusion.

49 male Wistar albino rats were used in 5 groups. 1-SHAM (n=7); 2-Ischemia-reperfusion (REP) (n=12); 3-Sylymarin (200 mg/kg) + Ischemia-reperfusion (SIR) (n=9); 4-Thymoquinone (3 mg/kg) + Ischemia-reperfusion (TIR) (n=11) 5-Sylymarin (200 mg/kg) + Thymoquinone (3 mg/kg) +ischemia-reperfusion (STIR) (n=10). Active substances were applied ip for 14 days. On the 14th day, 30 minutes of ischemia was induced in rats by bilateral carotid artery ligation. Euthanasia was performed 24 hours after reperfusion, and tissue samples were taken.

In addition to the neurological examinations and general histopathology of the subjects, apoptosis was evaluated with anti-caspase-3 antibody and TUNEL method, while astrocyte activation was evaluated with anti-GFAP antibody. Total antioxidant (TAS) and total oxidant (TOS) levels, oxidative stress index (OSI), and TMAO levels were evaluated from serum samples.

In the neurological examinations, the SHAM group had the lowest and the REP group had the highest values ($p=0.001$). Although the scores of the SIR, TIR, and STIR groups were lower than the REP group, the difference between them was not significant.

In the histopathological evaluation: while increased degeneration was observed in the REP group, degeneration decreased in the SIR, TIR, and STIR groups. While TUNEL and caspase-3 positive cells increased in the REP group, there was a significant decrease in the SIR, TIR and STIR groups compared to the REP group ($p<0.05$). In the cerebellum TUNEL evaluation, while the values of the SHAM group were significantly lower than all groups ($p<0.05$), there was no significant difference between the other groups. While GFAP expression had higher values in the REP group than in all groups ($p<0.05$), there was no significant difference between the other groups.

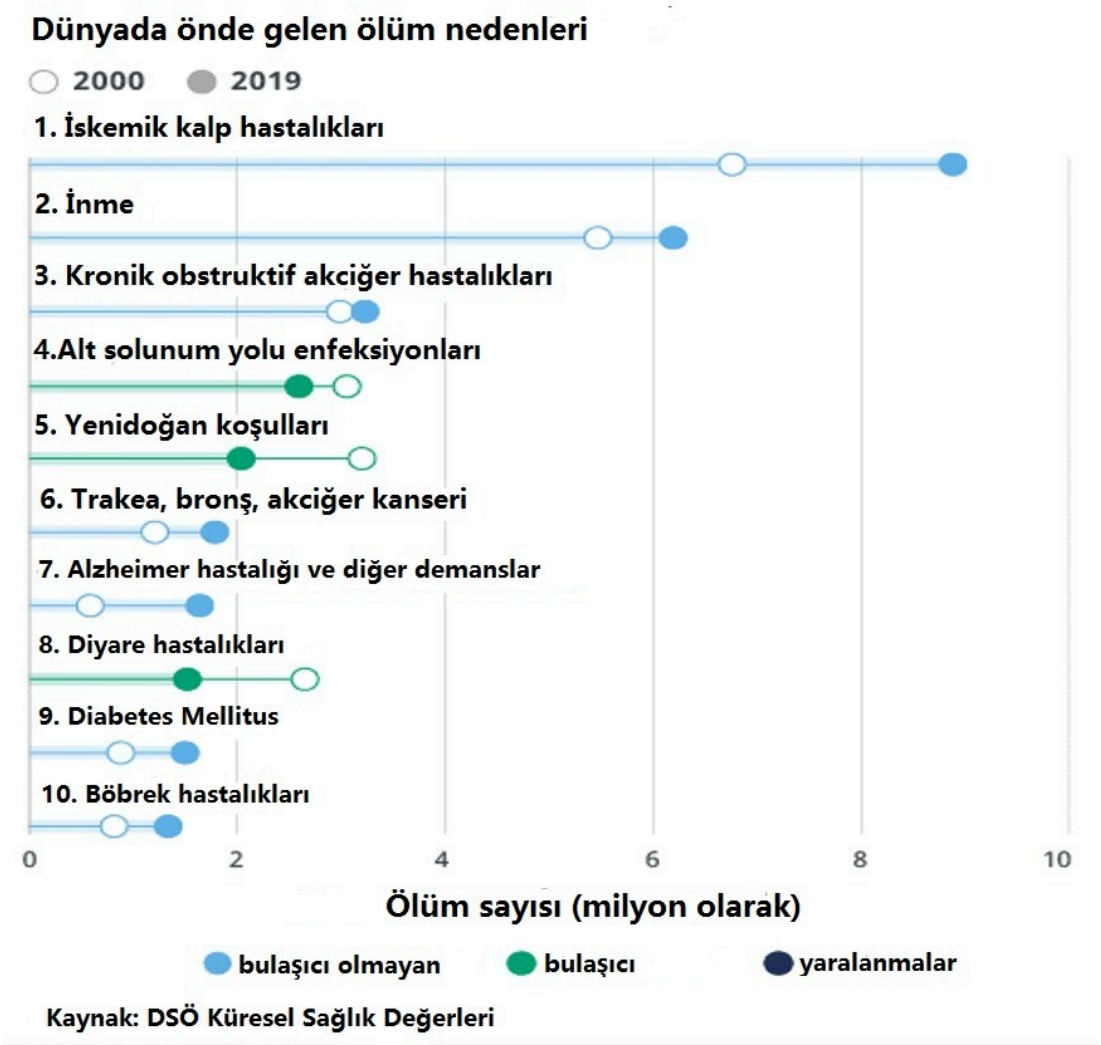
While there was a significant increase in TAS values in the SIR and TIR groups compared to the REP group ($p<0.05$), but no significant difference in TOS and OSI values. Although TMAO values decreased in SIR, TIR, and STIR groups, only the decrease in the STIR group was significant compared to REP and SHAM groups ($p<0.05$).

According to these data, although the use of silymarin and thymoquinone as a prophylactic against brain ischemia-reperfusion injury partially improves neurological deficit, morphological parameters, apoptosis, and astrocyte activation, their combined use does not provide additional benefit. While there is an increase in TAS values, this is not reflected in OSI values. Also, at TMAO levels, the combined use was considered to be more effective.

Key Words: apoptosis; cerebral ischemia-reperfusion; oxidative stress; silymarin; thymoquinone

1. GİRİŞ

Serebrovasküler hastalıklar veya beyin damar hastalıkları, temel olarak beynin bir bölgesinin geçici veya kalıcı olarak beyin damarlarında meydana gelen bir tıkanma, kanama veya bu ikisinin kombinasyonu nedeniyle etkilendiği tüm hastalıkları kapsamaktadır. Bu hastalıklara kan damarlarının çok çeşitli patolojileri, anevrizmalar ve vasküler malformasyonlar ve hematolojik bozukluklar neden olabilir. Diğer nedenlerin yanı sıra kardiyorespiratuar arreste bağlı azalmış beyin perfüzyonu, hipovolemik şok, siyanür, sülfit veya karbon monoksit zehirlenmesi gibi durumlar da serebrovasküler hastalıklara sebep olabilir (Ferrer ve Vidal 2017). Beyin iskemi ya da kanama gibi vasküler hastalıklara karşı en dayanıksız organdır. Dünya çapında en önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerinden biri serebral iskemidir (WHO 2020) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. DSÖ dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri (DSÖ 2020).

İskemi; bir organ veya dokunun, kan akımının azalması veya kesilmesinden dolayı yetersiz perfüzyonu sonucu oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanabilir. Oksijenden mahrum kalan hücrelerde biriken toksik metabolitler ve boşalan enerji depoları sonucunda hücre ölümü gerçekleşebilmektedir. Reperfüzyon ise azalan veya kesilen kan akımının dolayısıyla oksijenin dokuya tekrar sağlanması anlamına gelir. Eğer hücreler geri dönüşsüz şekilde hasarlanmadıysa hücreler oksijenin sağlanmasıyla iyileşebilirler. Ancak bu esnada oluşacak olan reaktif oksijen ürünleri de hücrelere zarar verebilmekte ve daha fazla hücre hasarına neden olmaktadır (Li ve Jackson 2002, Kumar ve ark 2018).

İskemi için halen en önemli tedavi kan akışının hızlı bir şekilde yeniden sağlanmasıdır. Ancak kan akışının başarılı bir şekilde yeniden sağlanması durumunda bile ilerleyici nöron dejenerasyonunun önüne geçilememektedir. Bu geciken nöron hasarında sitokinler, glutamat, nitrik oksit (NO), serbest radikaller ve prostaglandinler gibi proinflamatuar ajanların ve uyarıcı nörotransmitterlerin rol aldığı düşünülmektedir (Jian Liu ve Rosenberg 2005, Ikeda-Matsuo ve ark 2006, Watanabe ve ark 2016, Ferrari ve ark 2018). Dolayısıyla bu yolaklar üzerine pek çok tedavi seçeneği aranmıştır.

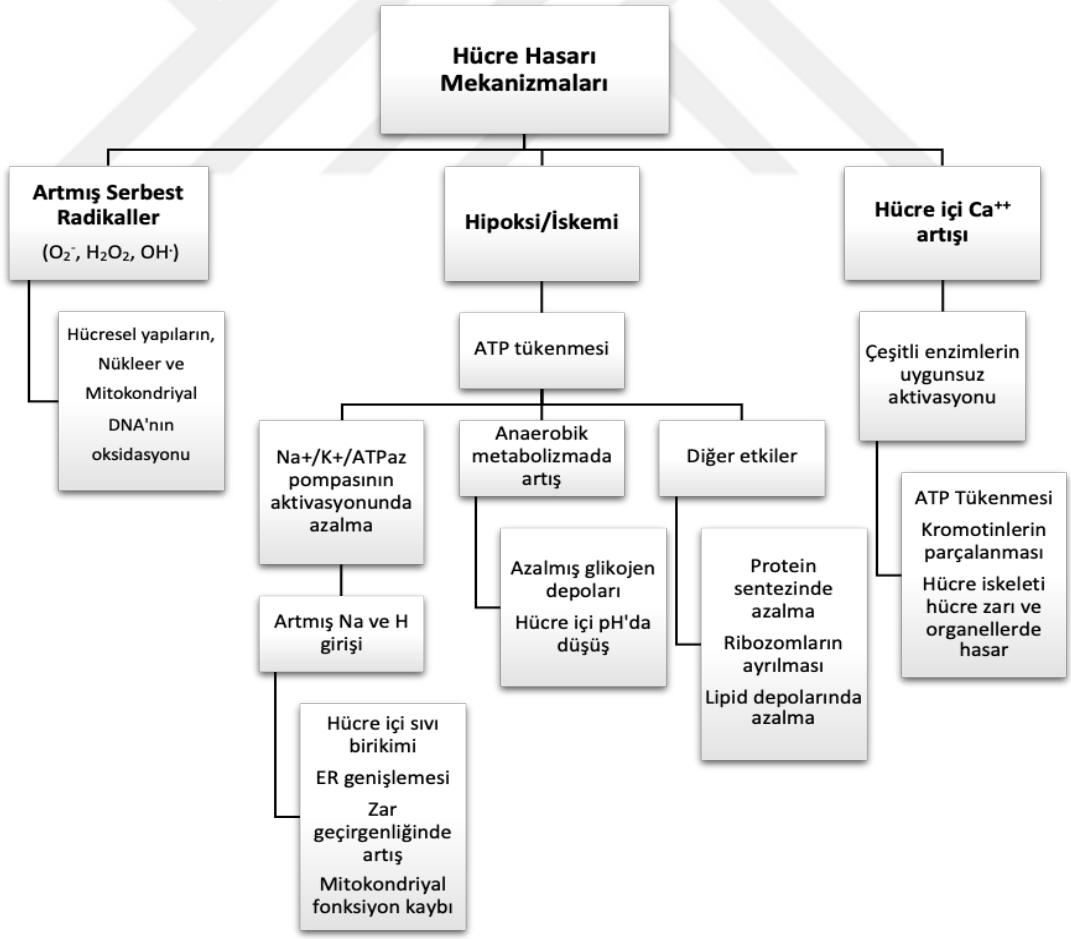
Silimarin antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuar, antiviral, apopitoz indükleyici, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, nöroaktif, nöroprotektif, antikanser gibi birçok etkisi bildirilmiş bir etken maddedir (Kren ve Walterova 2005, Kazazis ve ark 2014, Neha ve ark 2016, Ghobadi Pour ve ark 2017, Taleb ve ark 2018, Liu ve ark 2019). Nöroprotektif etkisi olduğuna dair birçok çalışma da mevcuttur (Borah ve ark 2013, Rathore ve ark 2020).

Timokinon üzerine yapılan birçok çalışmada antioksidan, antihistaminik, antiinflamatuar, gastroprotektif, antidiyabetik, hepatoprotektif ve immun sistemi güçlendirici etkilerinin olduğu aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apopitozu da önlediği gösterilmiştir (Ali ve Blunden 2003, Al-Enazi 2007, Ragheb ve ark 2009, Bouhlel ve ark 2017). Nöroprotektif etkisine dair çalışmalar da mevcuttur (Dong ve ark 2020).

1.1. Hücre Hasarı Mekanizmaları

Hücre hasarı, hücrelerin artık uyum sağlayamayacak kadar şiddetli strese girdiği veya hücrelere zarar veren ajanlara maruz kaldığı durumlarda ortaya çıkar. Hücre hasarı; azalmış oksijen kaynağı (solunum hastalığı, kardiyovasküler hastalık, anemi vb.), fiziksel etkenler (mekanik travma, aşırı sıcak veya soğuk, radyasyon), kimyasal maddeler (cıva, kurşun vb.), toksinler (bakteriler, bitkiler, hayvanlar vb.), virüsler, anormal immünolojik reaksiyon (aşırı duyarlılık durumları, glomerülonefrit), beslenme eksiklikleri (vitamin eksikliği ve emilim bozukluğu sendromları) ve genetik anormallikler (Down sendromu vb.) gibi birçok nedenle ortaya çıkabilir (Porth ve ark 2015).

Hücresel hasarın oluşmasında temelde 3 mekanizma vardır: Serbest radikal hasarı, hipoksi hasarı, hücre içi kalsiyum homeostazında bozulma (Porth ve ark 2015) (Şekil 1.2.).



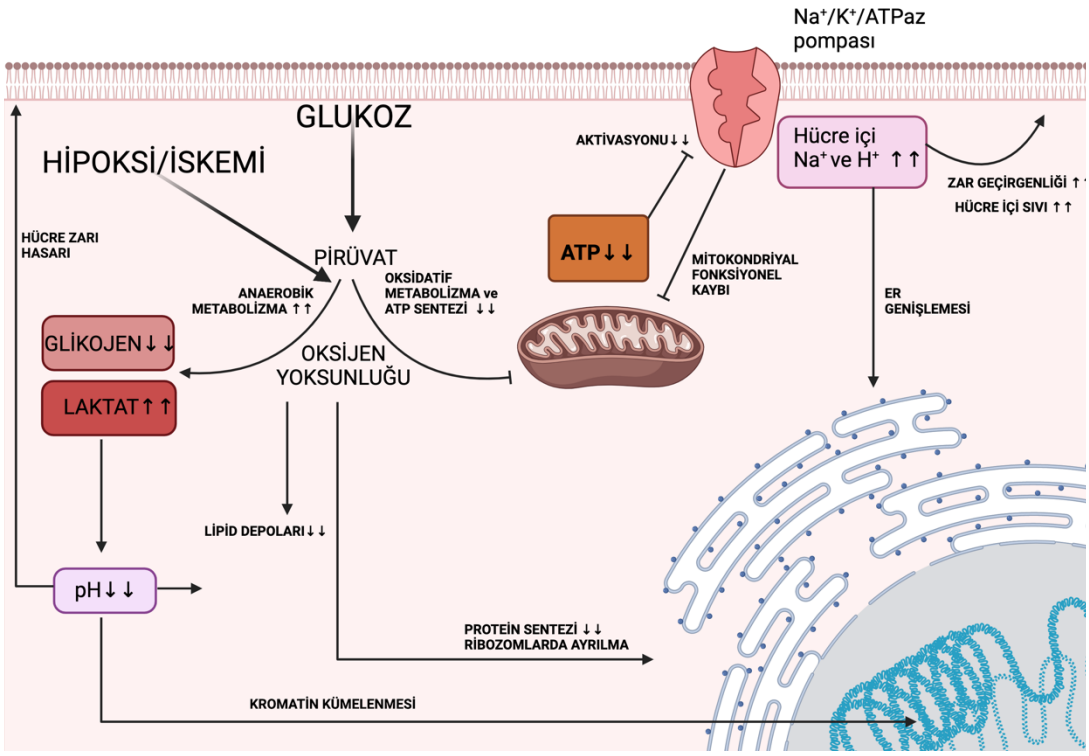
Şekil 1.2. Hücre hasarı mekanizmaları (Porth ve ark 2015).

1.1.1. Hipoksik Hücre Hasarı

Hücrenin oksijenden yoksun kalması oksidatif metabolizmayı ve ATP sentezini bozar. Hücrenin oksijen ihtiyacı hücrenin metabolik aktivitesine bağlıdır. Kalp, böbrek ve beyin işlevlerini yerine getirebilmek için yüksek miktarlarda enerjiye ihtiyaç duyar. Beyin hücreleri, 4-6 dakika hipoksi sonucu kalıcı hasara uğramaya başlar (Porth ve ark 2015, Kumar ve ark 2018).

Hücrenin oksijen yoksunluğu oksidatif metabolizmayı bozarak anaerobik metabolizmayı arttırır. Hücre sınırlı olan glikojen depolarını kullanır ve laktik asit birikimiyle birlikte hücre içi pH düşer. Düşük pH, kromatin kümelenmesine, hücre zarlarında ve hacminde değişikliğe neden olabilir (Porth ve ark 2015, Kumar ve ark 2018).

ATP'nin azalması sonucu ATP bağımlı çalışan Na^+/K^+/ATPaz pompasının aktivasyonu bozulur. Hücre içinde K^+ düşer ve Na^+ ve su birikimine bağlı olarak endoplazmik retikulum dilatasyonu, zar geçirgenliğinde artış, mitokondri işlevlerinde azalma oluşur ve hücre şişer (Kumar ve ark 2018). Şekil 1.3'te hipoksi/iskemi hasarı mekanizmaları özetlenmiştir.

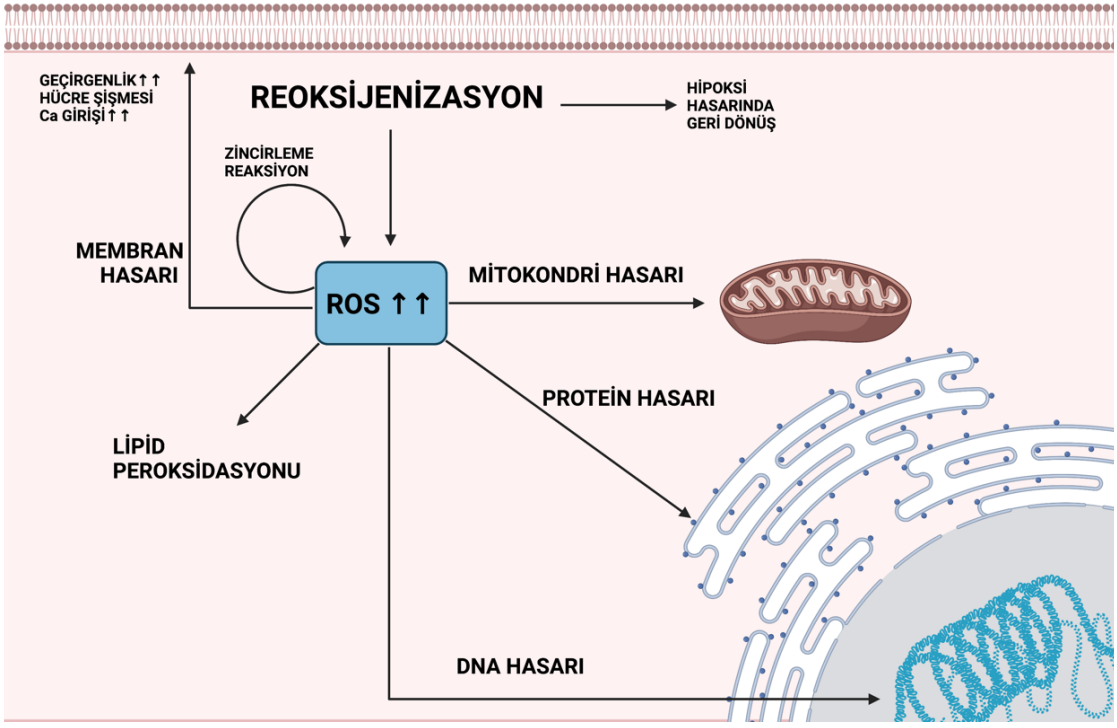


Şekil 1.3. Hücre hasar mekanizmaları; hipoksi/iskemi hasarı (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Belli bir noktaya kadar oksijen desteği yeniden sağlandığı takdirde bu değişiklikler geri dönüşlüdür. Ancak oksijenin yeniden dönüşü de serbest oksijen radikallerini arttırarak serbest radikal hasarına neden olabilmektedir (Porth ve ark 2015).

1.1.2. Serbest Radikal Hasarı

Serbest radikaller dış yörüngelerindeki eşlenmemiş elektronları nedeniyle oldukça kararsız ve reaktif kimyasallardır ve çevredeki moleküllerle özgül olmayan reaksiyonlara girerler. Hücre ve dokularda protein, lipit ve karbonhidratlarla reaksiyona girerek hücre zarı ve DNA hasarına ayrıca enzimlerin aktivasyonuna neden olurlar. Hücre geçirgenliğindeki artış hücrenin şişmesine ve hücre içi aşırı Ca^{++} girişine neden olur. Böylece hücre içi Ca^{++} homeostazında bozulmayı da tetikler. Ek olarak yeni serbest radikal oluşumuna da neden olarak zincirleme reaksiyonların oluşmasına neden olabilirler (Porth ve ark 2015, Kumar ve ark 2018). Şekil 1.4'te serbest radikal hasarı mekanizmaları özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Hücre hasar mekanizmaları; serbest radikal hasarı (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Serbest radikallerin birçoğu oksijen kaynaklıdır reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır ve insan vücudu için zararlıdır. ROS mitokondriyal solunum ve

enerji metabolizmasının normal ürünleridir ve normal şartlar altında antioksidatif sistemler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılırlar. Oksidatif stres iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı, radyasyon hasarı, O_2 ve diğer gazların toksisitesi gibi çeşitli durumlara bağlı olarak ROS oluşumunu vücudun nötralize ve elimine edemediği durumdur (Porth ve ark 2015).

İnme ve kalp krizi gibi perfüzyonun bozulmasından sonra kan akımının yeniden sağlandığı durumlarda hayati organlarda ROS'a bağlı hücre hasarı geliştiği görülmüştür (Kumar ve ark 2018).

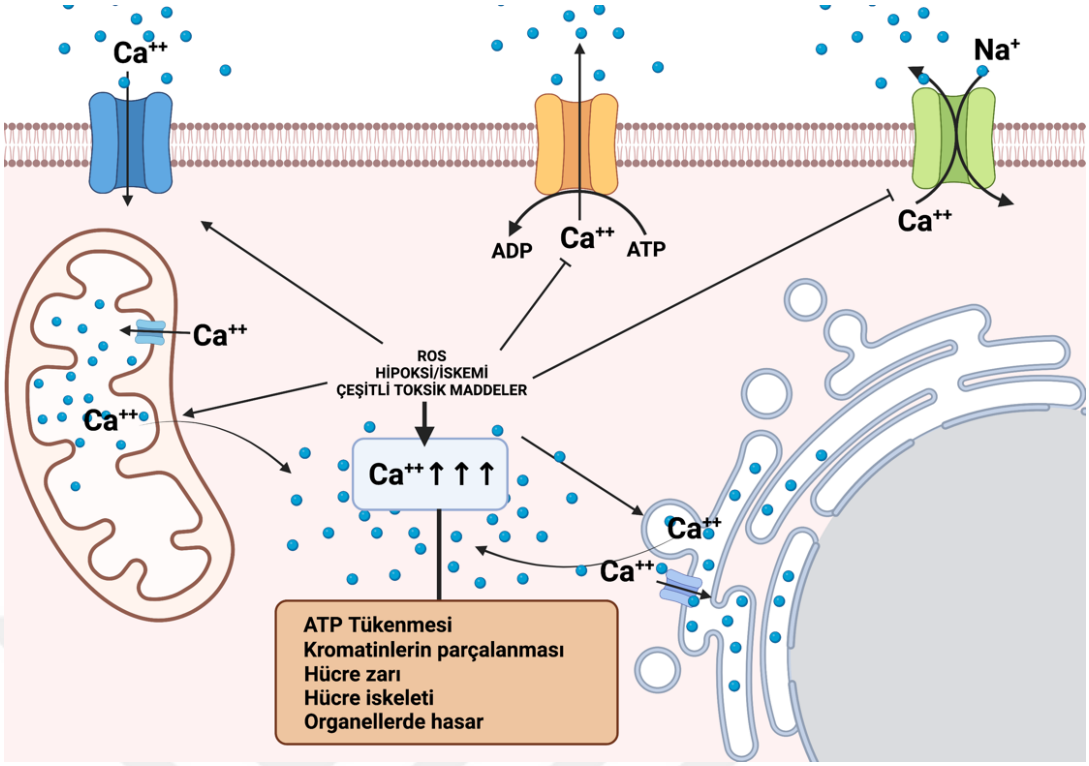
1.1.3. Kalsiyum Homeostasında Bozulma

Normal şartlar altında hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu hücre dışına göre oldukça düşük tutulmaktadır. Bu denge ATP bağımlı Ca^{++}/Mg^{++}/ATPaz pompası ve Ca^{++}'un mitokondri düz endoplazmik retikulum gibi organellerde çöktürülmesi ile sağlanmaktadır. İskemi, reperfüzyon ve benzeri durumlarda artan ROS ve bazı toksik durumlar bu dengeyi bozarak hücre içi kalsiyum artışına neden olmaktadır (Kumar ve ark 2018).

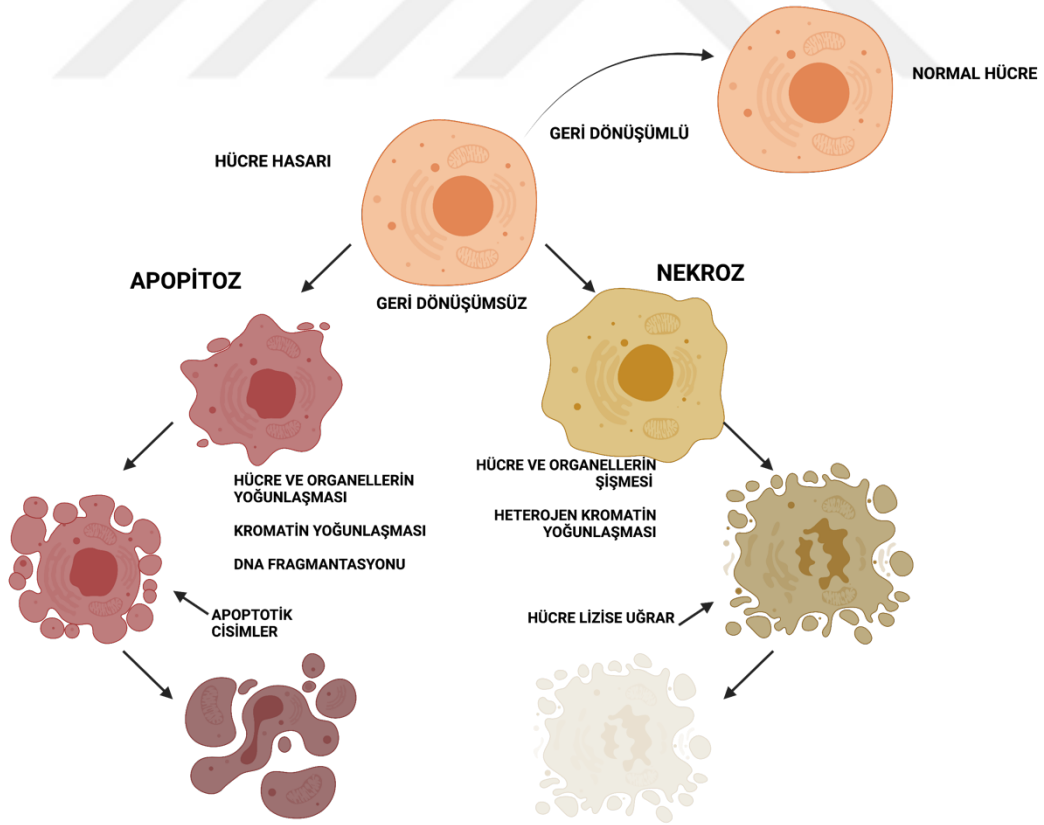
Kalsiyum hücre içi birçok yolakta ikincil haberci ve sitozolik sinyal görevi yapmaktadır. Artmış sitozolik kalsiyum enzimleri uygunsuz şekilde aktive ederek hücre hasarına neden olmaktadır. Bu enzimlerden fosfolipazlar hücre zarı hasarına, proteazlar hücre iskeleti hasarına, ATPazlar ATP tükenmesine, endonükleazlar kromatinin parçalanmasına neden olabilmektedir (Porth ve ark 2015, Kumar ve ark 2018). Şekil 1.5'te Ca^{++} artışına bağlı hücre hasarı mekanizmaları özetlenmiştir. Hücre hasarında sitozolde Ca^{++} birikimi olduğu bilinmesine rağmen bu durumun geri dönüşsüz hücre hasarına sebep olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

1.2. Hücre Ölümü Mekanizmaları

Hücre hasarı geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz (hücre ölümü) olabilir. Geri dönüşümlü hasar tipinde önemli yapısal ve fonksiyonel anormallikler meydana gelse de ağır membran ve çekirdek hasarı henüz oluşmadığından normal koşullar yeniden sağlanırsa hücre tamamen düzelebilir. Hücre ölümünün ise geri dönüşü yoktur ve iki farklı mekanizma söz konusudur: nekroz ve apopitoz (Macfarlane ve ark 2000, Kumar ve ark 2018) (Şekil 1.6.).



Şekil 1.5. Hücre hasarı mekanizmaları; Ca++ homeostazında bozulma (BioRender.com ile oluşturulmuştur).



Şekil 1.6. Hücre hasarı ve hücre ölümü mekanizmaları (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

1.2.1. Nekroz

Apopitotik hücre ölümünün alternatifi, rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilmeyen, hücrenin pasif olduğu ve enerjiden bağımsız, toksik bir süreç olarak kabul edilen nekrozdur. Ancak nekroz, hücre ölümünden sonra meydana gelen bozunma süreçlerine atıfta bulunduğundan, bazıları tarafından bir hücre ölümü mekanizmasını tanımlamak için uygun görülmemektedir. Bu nedenle onkozis karyolizis ve hücre şişmesi ile nekroza yol açan bir süreci tanımlamak için "onkotik hücre ölümü" veya "onkotik nekroz" ifadeleri kullanılabilmekle birlikte, yaygın olarak tercih edilmemektedir (Majno ve Joris 1995, Levin ve ark 1999).

Nekroz sonucunda hücre şişmesi; sitoplazmik vakuoller, ER şişmesi; sitoplazmada blebler (kabarcık); mitokondri hasarı, ribozomlarda ayrılma, organel zarlarında bozulma; lizozomlarda parçalanma ve hücre zarının bozulması gibi morfolojik değişiklikler meydana gelir (Kerr ve ark 1972). Hücre zarı parçalanması sonucu, sitoplazma içeriği çevre dokuya salınır ve inflamatuar hücrelere kemotaktik sinyaller gönderir (Trump ve ark 1997).

Yalnızca klasik histoloji tekniklerini kullanarak apopitozu nekrozdan ayırt etmek kolay değildir. Uyaranın yoğunluğu, süresi, ATP tükenme derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi pek çok faktöre bağlı olarak eşzamanlı olarak da ortaya çıkabilirler (Trump ve ark 1997).

1.2.2. Apopitoz

Apopitoz kavramının bazı bileşenleri yıllar önce açıkça tanımlanmış olsa da Apopitoz (a-po-toe-sis) terimi ilk olarak morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü biçimini tanımlamak için 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır. "Apopitoz" kelimesi, Yunanca’ da çiçeklerin veya ağaçların “yaprak dökmesi”ni tanımlamak için kullanılır (Kerr ve ark 1972).

Apopitoz, normal gelişimde, yaşlanma sürecinde ve homeostatik bir mekanizma olarak gerçekleşebildiği gibi, bir savunma mekanizması olarak hücreler zarar gördüğünde de gerçekleşebilir. Apopitoz hücre döngüsünün normal işleyişinde, immün sistem gelişimi ve işleyişinde, embriyonel gelişimde zaruri bir bileşen olarak kabul edilir. Patolojik apopitoz ise iskemik hasarda, nörodejeneratif rahatsızlıklarda, otoimmün hastalıklarda, birçok kanser çeşidinde ortaya çıkar (Elmore 2007).

Apopitoz, genetik olarak "programlanmış" hücre ölümünün önemli bir çeşidi olarak kabul edilmekle birlikte programlanmış hücre ölümünün başka biçimleri de tanımlanmıştır (Formigli ve ark 2000, Debnath ve ark 2005).

Erken apopitoz sürecinde, hücre büzüşmesi ve piknozis ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenebilir (Kerr ve ark 1972). Hücre büzüştüğünde küçülür, sitoplazması yoğunlaşır, organeller ise sıkı bir şekilde paketlenir. Piknozis ise, kromatin yoğunlaşması sonucu görülür ve apopitoz için karakteristiktir. "Tomurcuklanma" (budding) adı verilen bir süreç sırasında, geniş plazma zarı kabarması (blebbing) meydana gelir ve bunu, karyoreksis ve hücre parçalarının apopitotik cisimlere ayrılması izler. Apopitotik cisimler, nükleer fragman içeren veya içermeyen sıkıca paketlenmiş organellere sahip sitoplazmadan oluşur. Hücre membranı bütünlüğünü korur ve "apopitotik cisimcik"lere parçalanır. Apopitotik cisimler fagosite edildiği için inflamasyon beklenmez (Kurosaka ve ark 2003, Elmore 2007).

Apopitoz mekanizmaları, enerjiye bağlı moleküler olaylar zincirini içeren oldukça karmaşık yolaklardır. Bugüne kadar, araştırmalar iki ana apopitotik yol olduğunu göstermektedir: Ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu (TNF ve Fas ligand) ve intrinsik veya mitokondriyal yol. Bununla birlikte, iki yolağın birbiriyle ilişkili olduğu, bir yolaktaki moleküllerin diğer yolağı da etkilediğine dair kanıtlar mevcuttur (Elmore 2007). Apopitoz yolakları Şekil 1.7'de özetlenmiştir.

Mitokondri yolu (İntrinsik yol)

Apopitozu başlatan intrinsik yolaklar, hücre içindeki hedeflere direkt olarak yönelen ve mitokondri tarafından başlatılan, reseptör bağımsız olan, hücre içi uyarıcı sinyaller dizisinden oluşur. İntrinsik yolağı başlatan sinyaller, pozitif veya negatif bir yönde etki edebilir. Negatif sinyaller, belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir, bu da ölüm programlarının baskılanmasının başarısızlığına yol açarak apopitozu tetikler. Başka bir deyişle, faktörlerin geri çekilmesi, apopitotik baskılamanın kaybı ve ardından apopitozun aktivasyonu söz konusudur. Pozitif sinyaller ise enfeksiyonlar, toksinler, hipoksi, radyasyon hasarı, hipertermi, serbest radikaller olarak sayılabilir (Elmore 2007). Kaspazlar apopitozda rol oynayan proteazlardır. İlk sentezlendiklerinde inaktif prokaspaz olarak bulunurlar.

Prokaspaz inaktif form apopitozun uyarılmasından sonra kesilerek aktif kaspaz formuna dönüşürler (Adams 2003).

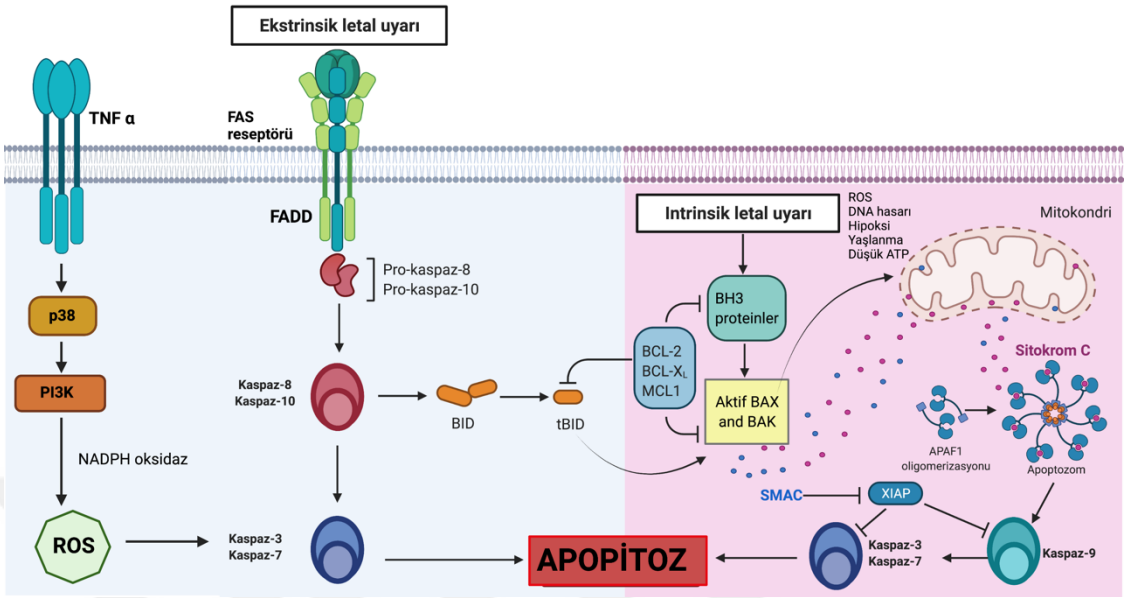
Apopitozun düzenlenmesi Bcl–2 / Bax gen ailesi üzerinden gerçekleşir. Yaklaşık 20 üyesi bulunan bu gen ailesinden bazıları antiapopitotik (Bcl-2, Mcl, Bcl-XL, Nr-13, Ced-9 vb.) özellikte iken diğerleri proapopitotik (Bcl-xs, Bax, Bad, Bak, Bid, Noxa, Bim vb.) genler olarak tanımlanır. Hücrenin yaşamını sürdürmesi bu proapopitotik ve antiapopitotik genlerin dengesine bağlıdır. Bcl–2/Bax ailesi ürünleri, çekirdek zarı, ER zarın ve mitokondri zarı üzerinde bulunmaktadır. Bcl–2 proteini, mitokondri dış zarı üzerinde ve çekirdek zarında, Bax proteinleri ise sitoplazmada mevcuttur. Apopitotik sinyalden sonra Bax proteinleri, mitokondri zarında permeabilite geçiş poruna bağlanarak seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir. Bu değişiklik ise sitokrom C ve AIF (Apopitoz İndükleyici Faktör) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörlerin sitoplazmaya geçmesine neden olur (Elmore 2007).

Normal şartlar altında apopitozu tetikleyici bir molekül olan Apaf-1, Bcl2 ile bağlı olduğundan apopitoz baskılanmış durumdadır. Hücre içi faktörlerin uyarılması sonucunda, Sitokrom C Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder. Meydana gelen komplekse apopitozom denir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu da diğer kaspazların aktivasyonunu başlatır (Adams 2003, Elmore 2007).

TNF ve Fas ligand (ölüm reseptörleri) yolu (Ekstrinsik yol)

Apopitozu başlatan ekstrinsik yolaklar ise, transmembran reseptör aracılı olarak, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörleri ile başlatılır (Locksley ve ark 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri, benzer sistin açısından zengin hücre dışı alanları paylaşır ve "ölüm alanı" (death domain) olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (Ashkenazi ve Dixit 1998). Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, en iyi tanımlanmış ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri Apo3L / DR3, FasL / FasR, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5, TNF-α / TNFR1 şeklinde sıralanabilir (Elmore 2007). TNFR1 ligasyonu, p38 aktivasyonu ile sonuçlanır. p38, PI3K sinyal yolunu ve ROS oluşumunu aktive eder. ROS, kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptoza yol açar. FADD ve prokaspaz-8 birleşerek prokaspaz-8'in katalitik aktivasyonunu başlatır. Bu da kaspazların aktivasyonunu başlatarak, hücreyi ölüme götürürler. Bu yol daha çok

immün cevap reaksiyonlarında ve infeksiyonlarda kullanılan bir yolaktır (Elmore 2007).



Şekil 1.7. Apopitoz, kaspaz bağımlı yolaklar: TNF ve FAS ligand (ölüm reseptörleri) yolu (ekstrinsik yol) ve mitokondri yolu (intrinsik yol) (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

1.3. Serebral İskemi Reperfüzyon Hasarı

Beyin, total vücut ağırlığının %2 sini oluşturduğu halde, toplam oksijenin %20'sini tüketmektedir. İskemi durumunda oksijen ve glikozun iletimi bozulmakta ayrıca metabolitler de uzaklaştırılamamaktadır. Serebral iskemi fokal ve global olmak üzere iki şekilde görülebilir.

1.3.1. Fokal iskemi

Serebral arterin çeşitli nedenlerle tıkanması sonucu meydana gelir. İskeminin devam etmesi durumunda etkilenen arterin beslediği alanda infarkt meydana gelebilir. İnfarkt alanının büyüklüğü başta kollateral dolaşım olmak üzere birçok faktöre bağlıdır (Ellison 2004).

1.3.2. Global iskemi

Genellikle kalp durması, şok ve ağır hipotansiyon gibi sistolik kan basıncın 50 mm Hg'nın altına düştüğü durumlarda meydana gelir. Beyin dokusunda hipoksiye karşı en duyarlı olan hücreler hipokampus ve neokorteksin piramidal hücreleri ile serebellumun Purkinje hücreleridir. Hafif iskemide geçici post iskemik konfüzyon

görülürken ağır iskemilerde ağır nörolojik kayıplar ve beyin ölümü görülebilir (Ellison 2004). İskeminin fokal veya global olması, hangi bölgeleri etkilediği serebral vasküler anatomiye bağlıdır.

1.4. Serebral Vasküler Anatomi

Beynin arteriyel kaynağı, proksimal dalları ile birlikte beynin tabanındaki subaraknoid boşluk içinde yer alan internal karotid ve vertebral arterlerdir. *Arcus aorta*'dan köken alan *a. brachiocephalica*, *a. carotis communis sinistra* ve *a. subclavia sinistra* önde karotis sistemi, arkada da vertebrobaziller sistemi oluşturan dallarını verirler. Dolayısıyla beyin arteriyel kan akımının kökeni, *arcus aorta*'dır. *A. carotis interna* ve dalları (Karotis Sistemi); *lobus occipitalis* dışındaki beyin hemisferlerinin kan akımını sağlarken; *a. vertebralis lobus occipitalis (vertebrobaziller sistem),* talamus, beyin sapı, serebellum ve omuriliğin kanlanmasını sağlar. Bu arterler ve dalları sağ ve sol olmak üzere çiftler halinde dağılırlar. Bir istisna olarak *a. basillaris* ventral yüzde ve orta hatta tek olarak bulunur ancak onun da dalları çiftler halinde dağılmaktadır (Standring 2016). Serebral vasküler anatomi değerlendirilirken karotis sistemi, vertebrobaziller sistem, Willis poligonu başlıkları altında değerlendirilebilir.

1.4.1. Karotis sistemi

A. carotis interna'lar ve dallarının oluşturduğu sistemdir. *A. cerebri media* frontal, parietal ve temporal lobların lateral yüzlerini beslerken *a. cerebri anterior* frontal lob ve parietal lobun medial yüzünü besler (Sobotta ve ark 2013).

1.4.2. Vertebrobaziller sistem

Vertebrobaziller sistem *a. subclavia'*dan ayrılan *a. vertebralis*'ler ile bunların ponsun ön yüzeyinde birleşmesiyle oluşan *a. basillaris*'ten meydana gelir. Buradan ayrılan dallar oksipital korteks, talamus, serebellum, beyin sapı, spinal kord, internal kapsül, bazal ganglia ve inferomezial temporal korteksi besler (Sobotta ve ark 2013).

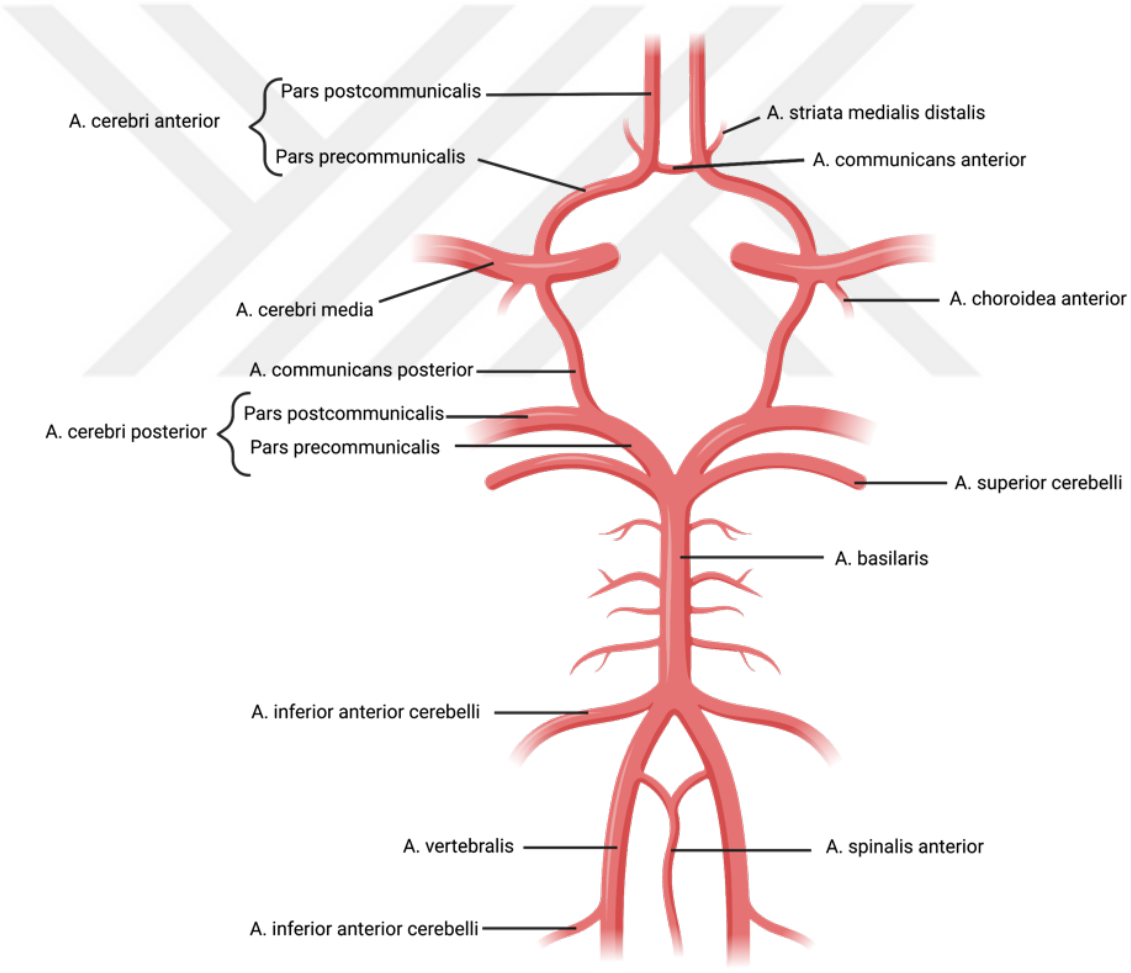
1.4.3. Willis poligonu

Willis poligonu; interpedünküler sisterna içerisinde *a. carotis interna* ve *a. basillaris*'in dallarından ve anastomozlarından meydana gelir. Willis poligonu önde *a. cerebri anterior* ve *a. communicans anterior*'dan oluşur. Arkada ise; *a. carotis*

interna'ları *a. cerebri posterior*'larla birleştiren *a. communicans posterior*'dan ve *a. cerebri posterior*'lardan oluşur (Sobotta ve ark 2013) (Şekil 1.8.).

1.4.4. Watershed alanlar

Watershed alanlar serebral arterlerin uç dallarının birbirleriyle anastomoz yaptıkları ve iskemi hasarına özellikle hassas olan alanlardır. Bu alanlarda global iskemide çok kısa sürede kalıcı hasar meydana gelir. Hemisferlerin üst bölümünde *a. cerebri anterior* ve *a. cerebri media*'nın terminal dalları arası, parietal ve oksipital lobda *a. cerebri posterior* ve *a. cerebri media*'nın terminal dalları arası, hemisferlerin medial kısmında *a. cerebri anterior* ve *a. cerebri posterior*'un terminal dalları arası watershed alanlardır (Standring 2016).



Şekil 1.8. Willis poligonu (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

1.5. Deney Hayvanlarında Serebral İskemi-Reperfüzyon Modelleri

İyi bir inme modeli söz konusu hastalığın etiyolojisini, anatomik, fonksiyonel ve metabolik sonuçlarını tekrarlanabilir şekilde oluşturulmalı ve ayrıca anti-iskemik ilaçların çalışmasına izin vermelidir (Small ve Buchan 2000, Gupta ve Briyal 2004).

Sıçan ve fare gibi kemirgenler deneysel iskemi modellerini oluşturmak için sıklıkla tercih edilirler**.** Özellikle sıçanlar, serebral kanlanmalarının ve fizyolojilerinin insana benzer olması nedeniyle serebral İ/R modellerinin oluşturulmasında yaygın bir şekilde kullanılırlar**.** Ayrıca bu kemirgenlerin çok büyük olmaması ve dokuların kolayca fikse edilmesi de tercih sebebidir (Ginsberg ve Busto 1989)**.**

Deney hayvanlarında oluşturulan Serebral iskemi modelleri; global, fokal ve ön beyin iskemi modeli olmak üzere üç gruba ayrılır.

1.5.1. Global Serebral İskemi Modelleri

Global iskemi modellerinde beyne giden kan akımının tamamen kesilmesi için total vücut iskemisi veya global serebral iskemi olmak üzere iki şekilde indüklenebilir. Geçici veya kalıcı olabilen yöntemler mevcuttur.

Total vücut iskemisi oluşturan modeller

Derin sistemik hipotansiyon

Farmakolojik ajanlarla indüklenebilir. Bu modelin avantajı, hayvanın resüsitasyonunun kolaylığıdır, ancak iskeminin şiddetindeki ve dağılımındaki değişkenlik en büyük dezavantajdır (Horst ve ark 1997).

Dekapitasyon veya kardiyak arrest

Hayvanların kafasının kesilmesi, global serebral iskemiye ulaşmanın en hızlı kolay yoludur. Ancak modelin dezavantajı, iskemi sonrası reperfüzyon çalışmalarının yapılamamasıdır. Modelin kullanımı, iskemi erken evre morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri ile sınırlıdır. İntravenöz magnezyum klorür enjeksiyonu ile oluşturulan kardiyak arrest modeli de global iskemi oluşturan başka bir yöntemdir. Aynı dezavantajlar bu model için de geçerlidir (Xie ve ark 1995).

Kardiyak arrest ve resüsitasyon

Kardiyak arrest oluşturmak için potasyum klorür enjeksiyonu, elektrik çarpması veya çıkan aortun mekanik olarak tıkanması yöntemleri kullanılabilirken, resüsitasyon için suni ventilasyon, kalp masajı veya elektrik defibrilasyonu kullanılır. İnsandaki kardiyak arresti taklit etmesi avantajdır, ancak sınırlı iskemik süre bu modelin kullanımını oldukça sınırlar. Çünkü 8 dakikadan daha uzun kardiyak arrest süreleri deney hayvanlarının hayatta kalma oranını düşürür. Ayrıca yoğun bakım ve çeşitli ilaçların kullanılması gerektirdiği için ilaç çalışmaları için çok uygun bir model seçeneği değildir (Kawai ve ark 1992).

Global serebral iskemi oluşturan modeller

Büyük damar oklüzyonu

Truncus brachiocephalicus ve *a. subclavia sinistra, a. carotis communis* sinistra toraks içinde klemplenir. Ayrıca *a. basillaris* ve iki *a. carotis communis'*in bağlanarak da global iskemi oluşturulduğu modeller mevcuttur. Tıkanıklık geçici olduğu için reperfüzyon çalışmaları için kullanışlı modellerdir (Horst ve ark 1997).

Artmış kafa içi basıncı

Arteriyel kan basıncı ile kafa içi basıncı arasındaki fark serebral perfüzyon basıncını verir. Eğer kafa içi basınç sistolik arter basıncından daha fazla artarsa, beyin kan akışı durur. Model bu prensibe dayanarak kafa içi basıncı çeşitli sıvıların enjeksiyonu ile arttırmayı hedefler. Enjekte edilen sıvının sıcaklığını değiştirerek beyin sıcaklığının kontrolünün kolay olması modelin en büyük avantajıdır. Ancak modelde global serebral iskemiye kolaylıkla ulaşılsa da birincil patolojik süreç intrakraniyal hipertansiyondur ve iskemi ikinci planda kalır (Ross ve Duhaime 1989).

1.5.2. Fokal Serebral İskemi Modelleri

Fokal iskemi modelleri, serebral arterin kalıcı veya geçici tıkanmasıyla oluşturulan modellerdir.

***A. cerebri media* oklüzyonu**

Kraniumda cerrahi olarak bir pencere açılır ve oklüzyon gerçekleştirilir. Modelin dezavantajı parankim hasarına ve/veya artmış kafa içi basıncına neden olabilmesidir (Chen ve ark 1986).

Serebral emboli/tromboz oluşturma modeli

Fotokimyasal fokal serebral tromboz oluşturma, kan pıhtısı embolizasyonu veya mikrosfer embolizasyonu ve benzeri çeşitli teknikler kullanılabilmekle birlikte reperfüzyon hasarı çalışmalarında kullanılamamaktadır (Horst ve ark 1997).

İntraluminal stür modeli (MCCAO)

Daha az invaziv olduğu için sıkça tercih edilen modelde, *a. carotis externa* bağlanır daha sonra, *a. carotis communis'*e sokulan propilen iplik *a. carotis interna* içinde ilerletilerek *a. cerebri media* girişinin tıkanması sağlanır. *a. cerebri media*'nın tıkanması sonucu iskemi hasarı oluşturulur. İp geri çekilerek reperfüzyon sağlanabilmekte böylece reperfüzyon hasarı çalışmalarında kullanılabilmektedir. Kemik ve beyin doku hasarı da olmaması, iskeminin en iyi taklit edildiği model olmasını sağlar (Longa ve ark 1989).

1.5.3. Ön Beyin İskemisi Modelleri

İki taraflı *a. carotis communis* tıkanması (BCCAO)

Her iki *a. carotis communis* klemplenmesi ile oluşturulur. Yaklaşık 15 dk iskemi sonucu neokorteks 3,4,5,6. tabakalarda, hipokampus CA1 bölgesinde ve striatumda nöronal hasar meydana gelir. Tıkanma geçici olarak sağlandığı için reperfüzyon çalışmalarında kullanılabilmektedir (Kuroiwa ve ark 1990).

Dört damar oklüzyon modeli

Her iki *a. vertebralis'*in elektrokoagülasyon yoluyla kalıcı olarak tıkanmasından sonra her iki *a. carotis communis* klemplenir. İskemi oluşturulduktan sonra klempler kaldırılarak reperfüzyon sağlanabilmesi modelin avantajıdır (Pulsinelli ve Buchan 1988).

İki taraflı A. carotis communis oklüzyonu ve hipotansiyon oluşturulması

Her iki *a. carotis communis*'in klemplenmesinin ardından bir miktar kan alınarak tansiyon düşürülür. Bu model de reperfüzyon çalışmalarına imkân verir (Horst ve ark 1997).

Hipertansiyonlu sıçanlarda iki taraflı *a. carotis communis* tıkanması

Hipertansif hale getirilmiş sıçanlarda *a. carotis communis*'lerin klemplenerek uygulanan modelde iskemi oluşumunun daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Horst ve ark 1997).

İnsanlardaki en yaygın inme türü fokal iskemidir. Özellikle orta serebral arterin veya internal karotis arterin tıkanması en yaygın yöntemdir (Gupta ve Briyal 2004). Arterlerin mekanik ligasyonu veya lümen içine yabancı bir madde verilerek emboli oluşturulması ile global veya fokal serebral iskemi modeli gerçekleştirilir. Mekanik ligasyon yöntemiyle oluşturulan modellerde trombotik süreçler söz konusu değildir. Fokal iskemi modellerinde tıkanmış arterin perfüzyon alanında iskemik kor ve penumbra meydana gelirken, global iskemi modelleri, kardiyak arestin patofizyolojisini taklit eden seçici nöronal hasara veya şiddetli sistemik hipotansiyona bağlı hemodinamik arreste neden olur ve (koroner arter oklüzyonu, kardiyak arrest veya bypass ameliyatlarına benzer olarak) beyni yaygın olarak etkileyerek hassas beyin bölgelerinde (hipokampus CA1 bölgesi, frontal korteks, serebellum Purkinje hücreleri gibi) seçici nöronal değişikliklere yol açar (Ginsberg ve Busto 1989, Small ve Buchan 2000, Gupta ve Briyal 2004).

1.6. İskemik İnmede Tedavi

İskemi-Reperfüzyon hasarının en sık görüldüğü iskemik inme tedavisinde ilk hedef reperfüzyonun sağlanması ile nörolojik hasarın, inmeye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılmasıdır. Reperfüzyon ne kadar hızlı sağlanırsa iskemi-reperfüzyon hasarının şiddeti de o kadar az olacaktır. Akut iskemik inmelerde tedaviler;

- Birincil koruma
- Genel inme tedavileri
- İskemik inme için özel tedaviler
- Komplikasyonların tedavisi
- İkincil koruma
- Rehabilitasyon olarak sıralanabilir (Özdemir ve ark 2015).

1.6.1. Birincil Koruma

Birincil koruma; değiştirilebilir risk faktörlerini içermektedir. Bunlar hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, sigara-alkol, yetersiz fiziksel aktivite, obezite ve sağlıksız beslenme, asemptomatik karotis darlıkları, atriyal fibrilasyon, orak hücreli anemi olarak sayılabilir. Birincil koruma; inme riskini azaltarak en az maliyetle en büyük faydayı sağlayabilir.

Kan basıncını 60 yaş üstünde 150/90 mmHg değerlerinin, 60 yaş altında 140/90 mmHg değerlerinin altında, tip 2 diyabetik hastalarda hemoglobin A1c'yi %7'nin altında ve LDL kolesterol düzeylerini normal kişilerde 190 mg/dL, 40-75 yaş diyabeti olan kişilerde 70-189 mg/dL altında tutmak, sigara ve alkol tüketimini kesmek veya kısıtlamak, fiziksel aktiviteyi arttırmak, sağlıklı beslenme alışkanlıkları geliştirmek, vücut kitle indeksini normal sınırlarda tutmak, eğer yüksek ise düşürmek birincil korumadaki öncelikli konulardır (Sağlık Bakanlığı, Akut İskemik İnme Tanı ve Tedavi Rehberi, 2020).

1.6.2. Genel İnme Tedavisi

İnmelerin tedavisinde kan şekeri, kan basıncı ve solunumun düzenlenmesi, sıvı replasmanı, vücut sıcaklığı ve beslenmenin takibi önemli genel parametrelerdir. Hastanın genel durumunu kontrol altında tutmak prognozu iyileştirebilir.

1.6.3. Özel İskemik İnme Tedavisi

İskemik inme için özel olarak uygulanan tedavileri içermektedir. Bunlar;

- İntravenöz trombolitik tedaviler,
- Endovasküler girişimsel tedaviler,
- Sonotromboliz tedavisi,
- Antiagregan ve antikoagülan ilaçlar olarak sıralanabilir.

İskemik inme tedavisi, sekeli azalttığı gösterilen intravenöz tromboliz ve endovasküler trombektomi sayesinde sağlanan hızlı reperfüzyon ile oldukça gelişmiştir. Bu tedaviler, kurtarılabilir beyin dokusunun görüntüleme kanıtı varsa, tıbbi bakıma geç başvuran seçilmiş hastalarda uygulanabilmektedir. Tedavi endikasyonlarını iyi belirlemek ve doğru zamanlama inme tedavisinde kritik öneme sahiptir (Özdemir ve ark 2015, Prabhakaran ve ark 2015).

1.6.4. Komplikasyonların Tedavisi ve Yoğun Bakım

İskemik inmelerde birçok yoğun bakım hasta grubunda olduğu gibi artmış kafa içi basıncı, pulmoner emboli, derin ven trombozu, üriner sistem enfeksiyonları, bası yaraları, yetersiz beslenme en sık karşılaşılan komplikasyonlardır ve yoğun bakım sürecinde dikkatli bir şekilde tedavi edilmeleri gerekmektedir (Özdemir ve ark 2015, Prabhakaran ve ark 2015).

1.6.5. İkincil Koruma

Hastanın hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, atriyal fibrilasyon gibi hastalıklarının kontrol altında tutulması, antiagregan ve/veya antikoagülanların kullanımı, ekstrakraniyal karotis darlıklarının, arteriyel diseksiyonların, patent foramen ovalenin takibi, postmenopozal hormon replasmanı, vitamin takviyeleri ikincil korumada göz önünde bulundurulması gereken durumlardır (Prabhakaran ve ark 2015).

1.6.6. Rehabilitasyon

Tüm bu tedaviler sonrasında hastanın rehabilitasyon ihtiyacı devam etmektedir. İnme sonrası çalışma hayatı ve sosyal işlevlerine geri dönebilme becerisi birincil önceliktir. İskemik inme sonrasında takip, tetkik ve tedaviler en iyi merkezlerde en hızlı şekilde yapıldığında bile inme, erişkinlerde yaşam süresini ve kalitesini ciddi şekilde azaltabilmektedir (Prabhakaran ve ark 2015).

Ayrıca, inme tedavisi için birinci basamak sağlık kuruluşları yeterli donanıma sahip değildir ve inme merkezleri de yeterince yaygın değildir. Bu nedenle, inme tedavisindeki tüm olumlu gelişmelere rağmen, alternatif tedavi ve koruyucu tedavi arayışları devam etmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarını doğrudan hedef alan antioksidan tedaviler, klinik öncesi sonuçlarda umut vadetmektedir (Poellmann ve ark 2018).

En çok araştırılan antioksidan tedavi seçeneklerinden biri de geleneksel tıpta uzun yıllardır kullanılmakta olan bitkisel tedavi seçenekleridir. Devedikeni bitkisinin etken maddesi olan silimarin ve çörek otu bitkisinin etken maddesi olan timokinon da antioksidan özelliği bilinen seçeneklerden ikisidir.

1.7. Deve Dikeni (Silybum Marianum) ve Silimarin

Kapalı tohumlu bitkilerden (Magnoliophyta) çift çenekliler (Magnoliopsida) sınıfı ve papatyagiller (Asteracea) familyasına ait otsu bir bitki olan Silybum marianum L. Gaertn, ülkemizde deve dikeni, deve kengeli veya sütlü kengel olarak da bilinir (Şekil 1.9.). Bitki temel olarak Afrika, Güney Avrupa ve Asya'da bulunmaktadır. Türkiye'de de özellikle Ege, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde, yol kenarlarında yaygın olarak görülür (Baytop 1984, Urry 2017). Taşlı topraklarda yetişen dikenli bir bitkidir. Boyu 40-100 cm'ye kadar büyür ve süt damarları içeren yapraklarıyla mor veya beyaz renkli çiçekleri vardır. Bitkinin tıbbi kısmı olan olgun tohumlarında uçucu esansiyel yağlar ile betaine, silimarin ve tiramin bulunmaktadır (Baytop 1984).

Ülkemizde bitkinin en çok görülen iki alt türü olan *S. marianum ssp. marianum* ve *S. marianum ssp. anatolicum*'un silimarin oranları %1'in üzerindedir (Baytop 1984). Deve dikeni sütü eski zamanlardan beri salatalarda, acı tonik olarak, emziren annelerde süt arttırıcı olarak, ayrıca varisli damarlar, amenore, uterin kanama, çeşitli mensturasyon problemleri, depresyon, dispepsi, gastrointestinal sistem ve karaciğer hastalıklarında kullanılmıştır (Flora ve ark 1998, Neha ve ark 2016). Üstelik bitkinin hamilelerde, çocuklarda ve yaşlılarda güvenle kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Cwalina-Ambroziak ve ark 2012).

Devedikeninin kurutulmuş meyvelerinin başlıca ekstresi olan silimarin, çeşitli flavonolignanlar ve isoflavanoid olan taksifolinden oluşur. En aktif ana bileşeni (%60) silibindir. Ancak yapısında bulunan; izosilibin, silidianin ve silikristin gibi diğer flavonolignanların ve taksifolinin de biyolojik etkide rol oynadığı düşünülmektedir (Valenzuela ve Garrido 1994, Pradhan ve Girish 2006, Nencini ve ark 2007).

Flavonoidler renklerinden ötürü Latince "sarı" anlamına gelen "flavus" kelimesinden türetilerek isimlendirilmiştir (Kahraman A 2002). Polifenol bileşikleri arasında yer alan flavonoidler iki benzen halkasının heterosiklik piron/piran halkası yardımıyla birleşmesinden oluşan yapılardır. Kimyasal özelliklerine göre; flavanol, flavonol, flavon ve isoflavonoid alt gruplarına ayrılır (Moon ve ark 2006).

Flavonoidler uzun yıllardır araştırılmakla birlikte antioksidan etkilerinin dışında immunstimulan, vazodilatatör, östrojenik, antialerjik ve antiviral etkilerinin

bulunduğu ve α tokoferol rejenerasyonu, bakır ve demir şelasyonunda da rol oynadığı son dönemde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Moon ve ark 2006). Çay, soğan, elma, baklagiller ve domates gibi sık tükettiğimiz besinlerde de bolca bulunan flavonoidlerin sayısının 4.000 civarında olduğu düşünülmektedir (Bors ve ark 1990, Stavric 1994, 1994). Devedikeni tohumlarının kuru ekstresi taksifolin, eriodiktiol ve krisoeriol gibi flavonoidler de içerir ve antioksidan, antidiyabetik, antinflamatuar, antiviral, apopitoz indükleyici, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, nöroaktif, nöroprotektif, antikanser gibi birçok etkilerinde flavonoidlerin de rolü olduğu düşünülmektedir (Valenzuela ve Garrido 1994).

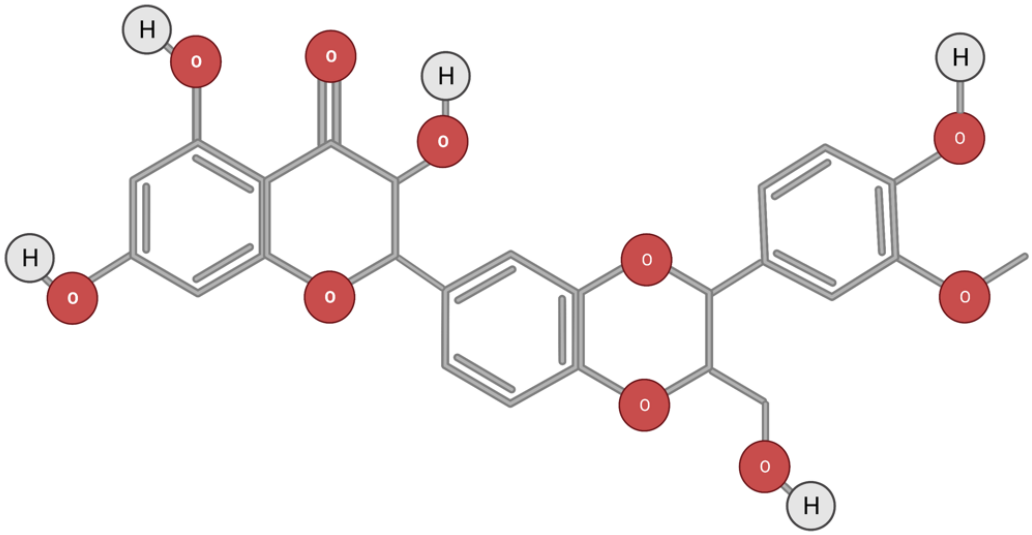


Şekil 1.9. Deve dikeni (Silybum Marianum) (Resim Capri23auto tarafından Pixabay'a yüklendi).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda devedikeninin etken maddesi olan silimarin (3,5,7-trihidroksi-2-[3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-(hidroksimetil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioksin-6-yl]-2,3-dihidrokromen-4-one/$C_{25}H_{22}O_{10}$), kronik hepatit, siroz, alkol ile ilişkili karaciğer hastalıkların tedavisinde destekleyici olarak kullanılmaya başlanmış, ayrıca yapılan çalışmalar bu maddenin antioksidan, antidiyabetik, antinflamatuar, antiviral, apopitoz indükleyici, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, nöroaktif, nöroprotektif, antikanser gibi birçok etkilerinin

olduğunu bildirmiştir (Kren ve Walterova 2005, Kazazis ve ark 2014, Neha ve ark 2016, Ghobadi Pour ve ark 2017, Taleb ve ark 2018, Liu ve ark 2019)(Şekil 1.10).

Silimarinin oldukça güvenli bir madde olduğu kabul edilmektedir. Yapılan bir meta analiz çalışmasında yalnızca üç ciddi yan etki gösterilmiştir. Bunlar; iki hastada S. Marinum çayının sindiriminden sonra tanımlanan anafilaksi ve bir hastada da devedikeni sütü içeren bitkisel formül kombinasyonunun neden olduğu gastroenterittir (Jacobs ve ark 2002). Silibininin düşük çözünürlüğü sebebiyle in vivo şartlarda toksik konsantrasyona ulaşması neredeyse imkânsızdır. Silibininin CYP1A2 ve CYP3A4'ün ekspresyonunu engellemediği ve ancak fizyolojik olarak aşırı dozlarda sitokrom P450 (CYP) izoenzimlerinin katalitik aktivitelerini inhibe ettiği belirlenmiştir (Kosina ve ark 2005). Bu sonuçlar silimarinin ilaç-ilaç etkilerinde olumsuz etkisinin olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte silimarinin etki mekanizmalarının ve yan etkilerinin detaylı olarak anlaşılması için daha ayrıntılı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (Kren ve Walterova 2005).



Şekil 1.10. Silimarinin yapısal formülü (Biorender.com ile oluşturulmuştur).

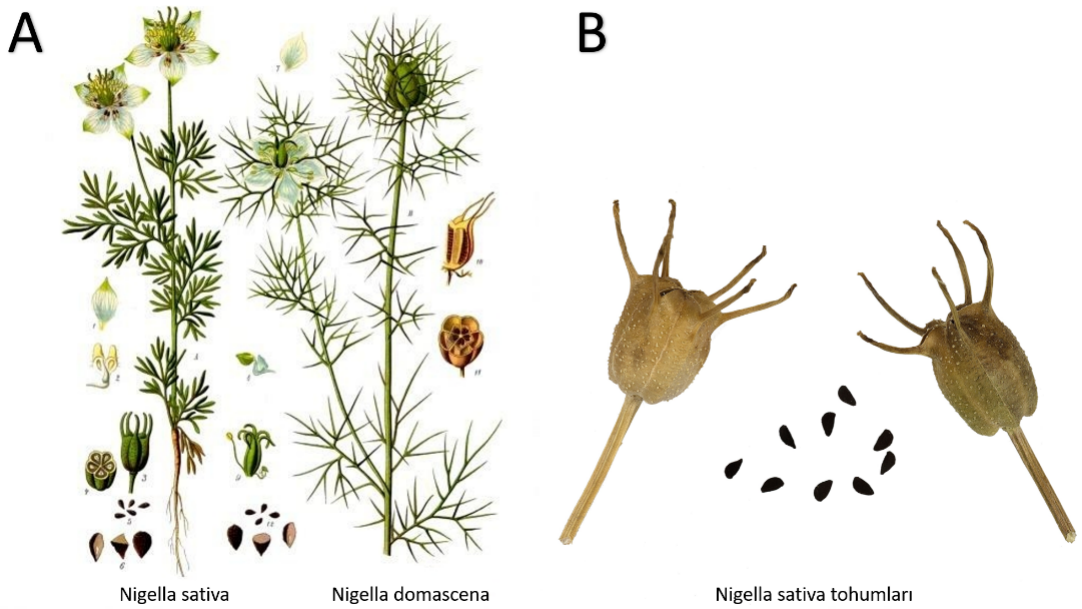
Suda çözünmeyen yapısı nedeniyle bitkisel çay olarak tüketilemeyen silimarinin bitki ekstresi içeren kapsül formları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar oral alımlar sonrası maksimum plazma konsantrasyonuna 4-6 saatte çıktığını göstermiştir.

Yarılanma ömrü 6-8 saattir ve esas olarak safra yoluyla ve bir miktar da böbrekler yoluyla atılmaktadır (Morazzoni ve ark 1993).

1.8. Çörek Otu (Nigella Sativa) ve Timokinon

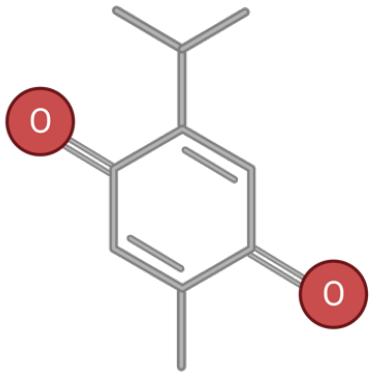
Düğün çiçeğigiller (L. Ranunculaceae) familyasına ait olan çörek otu ya da Nigella Sativa özellikle Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye'de yaygın olarak yetişir. İnce bölünmüş yapraklara sahip, 20-90 cm büyüyen, yıllık çiçekli bir bitkidir (Ahmad ve ark 2013) (Şekil 1.11.). Bitkinin cinsine, yetiştiği iklime ve hasat zamanına bağlı olarak kimyasal bileşiminde birtakım değişiklikler gözlenebilir. Ancak başlıca aktif bileşenleri arasında timokinon, ditimokinon, timohidrokimon ve timol sayılabilir (Ghosheh ve ark 1999). Bu bileşiklerin %30–48'ini timokinon oluşturur ve farmakolojik olarak en potansiyel aktif bileşiktir. Moleküler ağırlığı 164,2 g/mol olan timokinon 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon ($C_{10}H_{12}O_2$) formülüyle bilinmektedir ve kristalize, sarı renkte, uçucu bir monoterpendir (Şekil 1.12.). Monoterpenlerin enerji metabolizması üzerine etkileri olduğu bilinmektedir (Shuid ve ark 2012).

Timokinon hidrofobik bir moleküldür, bu nedenle çözünürlüğü, biyoyararlanımını etkileyebilecek ve ilaç formülasyonunda sınırlamalara neden olabilecek bir zorluktur ve timokinonun LD50'si (ölümcül doz) de, suda çözünmeyen yapısı nedeniyle uygulama yoluna ve kullanılan araca bağlıdır (Özbek ve ark 2004, Ahmad ve ark 2019). Bir çalışmada sıçanlara intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildiğinde timokinon için 10 mg/kg'lık bir LD50 bildirmiştir (el-Dakhakhny 1965). Başka bir çalışma, 4, 8, 12.5, 25 ve 50 mg/kg i.p. enjeksiyonda farelerde serum alanin transaminaz (ALT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi biyokimyasal parametreleri değiştirmediğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, ip enjeksiyonla fareler için LD50 90.3 mg/kg idi (Mansour ve ark 2001).



Şekil 1.11. A: Nigella Sativa ve Nigella Domascena çizimleri (Köhler 1897) **B:** Nigella Sativa meyvesi ve tohumları (Culos 2015).

Timokinonun antioksidan, sitoprotektif anti-inflamatuar ve anti-kanser etkilerini belirlemek için yürütülen diğer birçok çalışmada, araştırmacılar, önemli bir toksisite olmaksızın farelere ve sıçanlara ip olarak enjekte edilen 5 ila 12.5 mg/kg arasındaki dozların kullanımları bildirilmiştir (Badary ve ark 1997, Nagi ve ark 1999, Mansour ve ark 2001). Timokinonun hesaplanan emilim yarı ömrü (T1/2) yaklaşık 217 dakikadır (Alkharfy ve ark 2015). TQ, kısa bir süre maruz kaldıktan sonra bile ışığa karşı oldukça hassastır. Kısa süreli ışığa maruz kalması dahi, çözelti pH'ından ve solvent türünden bağımsız olarak ciddi bozulmaya neden olmuştur (Salmani ve ark 2014).



Şekil 1.12. Timokinon yapısal formülü (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Eski zamanlardan bu yana çörek otu bitkisi orta ve uzak doğuda ve özellikle de İslam inancına sahip coğrafyada geniş bir kullanıma sahiptir (Bukhari, 1981). Burun tıkanıklığında, astımda, hipertansiyonda, bağırsak kurtlarının tedavisinde, baş ağrısında ve emziren kadınlar için süt arttırıcı olarak kullanılmıştır (Mohamed ve ark 2005, Salem 2005). Timokinonun üzerine yapılan birçok çalışmada antioksidan, antihistaminik, antiinflamatuar, gastroprotektif, antidiyabetik, hepatoprotektif ve immun sistemi güçlendirici etkilerinin olduğu gösterilmiştir (El-Mahmoudy ve ark 2002, Ali ve Blunden 2003, Türkdoğan ve ark 2003, Isik ve ark 2005, Salem 2005, Al-Enazi 2007, Ayaz ve ark 2007, Ragheb ve ark 2009, Attia ve ark 2010, Fararh ve ark 2010, Meydan ve ark 2019). Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apopitozu da önlediği gösterilmiştir (Bouhlel ve ark 2017). Timokinonun, etanol aracılı mitokondriye bağlı apopitozu azaltarak prenatal sıçan kortikal nöronlarında etanol kaynaklı nöronal apopitoza karşı koruyucu bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Ullah ve ark 2012).

Timokinon uygulamasının; kültürlenmiş sıçan primer hipokampal kaynaklı nöron hücrelerinde ve insan pluripotent kök hücre kaynaklı nöron hücrelerinde sinüklein kaynaklı sinaptik toksisiteye karşı güçlü koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Alhebshi ve ark 2014). Ayrıca morfine bağlı beyin oksidatif stresini ve farelerde morfin toleransı ve bağımlılığının gelişimini bastırdığı bildirilmiştir. Beyin glutamat seviyesindeki yükselme ve beyin iNOS ve morfin tarafından aşırı NO üretiminin ekspresyonundaki artış timokinon ile azaltılabilir (Abdel-Zaher ve ark 2013).

Timokinon, sıçan hipokampüsünde geçici ön beyin iskemisinin neden olduğu hasara karşı etkili bulunmuştur. İskemiden 5 gün önce ve reperfüzyon süresince (oral 5 mg/kg/gün) timokinon uygulaması ölü hipokampal nöronal hücrelerin sayısındaki azalma ortaya koyduğu gibi, ön beyin iskemisinin neden olduğu nöronal hasarı azaltmıştır (Hosseinzadeh ve ark 2007).

Apopitoz, ROS üretiminin bir sonucu olarak da ortaya çıkabilmektedir. Timokinon, konsantrasyonuna bağlı olarak bir antioksidan veya prooksidandır. Timokinon, daha düşük konsantrasyonlarda antioksidandır ve mekanizmayı açıklayan çalışmaların çoğu, antioksidan etkilere değinmiştir. Bununla birlikte, timokinonun en az bir raporda yüksek konsantrasyonlarda prooksidan olduğu gösterilmiştir.

timokinonun kısmen oksidanların doğrudan katılımı yoluyla apopitotik hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir (Zubair ve ark 2013).

Timokinonun nörodavranışsal skorları önemli ölçüde iyileştirdiğini, serebral enfarktüs alanını azalttığını, beyin ödemini azalttığını ve yaralanmayı takiben normal nöron sayısını artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Tian ve ark 2020).

1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarının Klinik Değerlendirilmesi

1.9.1. Nörolojik Muayene ve Toklu'nun Modifiye Nörolojik Muayenesi

Global İ/R çalışmalarında sıklıkla klinik değerlendirmede nörolojik bir muayene kullanılmamaktadır. Bu da bulguların kliniğe yansımasını değerlendirmede bir sınırlılığa sebep olmaktadır. Fokal iskemi oluşturulan modellerde Longa ve arkadaşları yaptıkları 5 puanlı bir skor kullanmışlardır (Longa ve ark 1989). Bu skorlama Tablo 1.1.'deki gibidir. Daha sonra aynı skorlamayı kullanan çalışmalar olmuştur (Hou ve ark 2020). Fokal İ/R modellerinde ayrıca Bederson'ın nörolojik fonksiyon testi (Tablo 1.2.) ve Garcia'nın davranış puanı (Tablo 1.3.) da kullanılabilmektedir.

Toklu'nun modifiye nörolojik muayenesi, Garcia'nın davranış puanının ve Bederson'ın nörolojik fonksiyon testinin modifiye edilmiş birleşimi olup denge, kas gücü, koordinasyon ve refleks değerlendirmesinin kombinasyonudur (Bederson ve ark 1986, Garcia ve ark 1995, Toklu ve ark 2019). Sepsise bağlı ensefalopatili sıçanların nörolojik skorlarına erişmek için, iskemik inme, ağırlık bırakma travması ve yüksek basınç patlama travması gibi beyin hasarı modellerinde kullanılmıştır (Biber ve ark 2009, Ersahin ve ark 2009, Toklu ve ark 2009, Erşahin ve ark 2010, Toklu ve ark 2018).

Motor ve davranışsal eksiklikleri değerlendirmek için 20 puanlık bir skorlama kullanılmaktadır. Bilinç, eğimli (45°) platforma tırmanma performansı, ekstremite tonusu, yürüme ve postural refleksler, rotasyon hareketi ve nosiseptif uyaranlara yanıt değerlendirilir (Toklu ve ark 2019). Skor ne kadar yüksekse, nörolojik defisit o kadar şiddetlidir.

Tablo 1.1. Longa'nın nörolojik skoru.

SKOR	NÖROLOJİK DEFİSİT
0	Nörolojik defisit yok
1	Hafif bir fokal nörolojik defisit (Sol ön patiyi tamamen uzatamama)
2	Orta derecede fokal nörolojik defisit (Sola doğru dönerek)
3	Ciddi fokal defisit (Sola düşme)
4	Spontan yürümeme ve depresif bilinç seviyeleri

Tablo 1.2. Bederson'ın nörolojik fonksiyon testi.

SKOR		NÖROLOJİK DEFİSİT
NORMAL	**DERECE 0**	Gözlemlenebilir eksiklik yok
ORTA	**DERECE 1**	Ön ayak fleksiyonu
ŞİDDETLİ	**DERECE 2**	Çemberleme olmaksızın yanal itmeye (ve ön ayak fleksiyonuna) karşı azalmış direnç
	DERECE 3	Ciddi fokal defisit (Sola düşme)

Tablo 1.3. Garcia'nın davranış puanı.

TEST	SKOR			
	0	**1**	**2**	**3**
Spontan aktivite (5 dakika kafeste)	Hareket yok	Zar zor hareket	Hareket var ama kafesin en az üç kenarına ulaşamaz	Hareket var ve kafesin en az üç kenarına ulaşır
Hareketlerin simetrisi (dört uzuv)	Sol taraf: Hareket yok	Sol taraf: Hafif hareket	Sol taraf: Yavaş hareket	Her iki taraf: simetrik hareket
Ön ayak simetrisi (kuyruk tutulurken uzanma)	Sol taraf: hareket yok, uzanma yok	Sol taraf: uzanmak için hafif hareket	Sol taraf: sağdan daha az hareket ve uzanma	Simetrik uzanma
Tel kafes duvarına tırmanma	…	Tırmanmada başarısız	Sol taraf zayıf	Normal Tırmanma
Gövdenin her iki tarafına dokunmaya tepki	…	Sol tarafta yanıt yok	Sol tarafta zayıf tepki	Simetrik tepki
Vibröz dokunuşa tepki	…	Sol tarafta yanıt yok	Sol tarafta zayıf tepki	Simetrik tepki

Hızlı değerlendirme sağlaması ve düzenek kurulumunun kolay olması nedeniyle bu ölçek, travmatik beyin hasarı ve inmeyi takiben nörolojik semptomları değerlendirmek için pratik bir yöntemdir. Beyin hasarı, nöron ölümü, oksidatif hasar, kan-beyin bariyeri bozulması, beyin ödemi, otonomik dengesizlik ve metabolik işlev bozukluğu gibi çok çeşitli mekanizmaların bir kombinasyonudur. Yaygın beyin hasarı sonucu otonom sinir sistemi aktivitesindeki değişikliklere bağlı olarak davranışsal sonuçlar her zaman histolojik değişikliklerle uyumlu olmayabilir. Dolayısıyla dokularda nöroproteksiyon elde edilmiş olsa bile, bu önemli ölçüde daha iyi bir nörolojik skorla sonuçlanmayabilir (Toklu ve ark 2019).

Bununla birlikte, Toklu ve arkadaşları iyileşmiş bir nörolojik skorun daha yüksek hayatta kalma oranı ve motor koordinasyonda daha iyi prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Toklu ve ark 2019).

1.9.2. Gliya Aktivasyonu ve GFAP

Gliyal fibriler asidik protein (GFAP), astrositin hücre bütünlüğünü ve esnekliğini sağlayan hücre iskeletinin önemli bir bileşeni, ara filament (IF) ağının esas proteinidir. Hücrenin yapısal özelliklerindeki önemli rolün yanı sıra, biyomekanik ve moleküler sinyallerin iletimi ile ilgili yeni IF ağ işlevleri ortaya çıkmıştır (Middeldorp ve Hol 2011).

GFAP, çoğu ökaryotik hücrenin hücre iskeletini mikrotübüller ve mikrofilamentlerle birlikte oluşturan IF ailesine aittir. IF'ler isimlerini filamentli formlarından ve ince aktin mikrofilamentleri (7 nm) ile kalın mikrotübüller (25 nm) arasındaki çaplarından (8-12 nm) almıştır. IF proteinleri, dizi homolojisine dayalı olarak 6 sınıfa ayrılır (Szeverenyi ve ark 2008). GFAP, vimentin, desmin ve periferin ile birlikte tip III IF proteini olarak sınıflandırılır. Tüm tip III IF proteinleri, hücre iskeletinin yapısında yer alır. IF'lerin belki de en iyi bilinen işlevi, diğer hücrelerle veya hücre dışı matrisle temas ettiği yerde plazma zarı için mekanik destek sağlamaktır. GFAP, hücrelerin şeklinin yanı sıra mekanik gücün korunmasına yardımcı olduğu düşünülen astrositlerde ifade edilir. Astrositler için bir belirteç olarak kullanan çok sayıda çalışmaya rağmen, GFAP'nin tam işlevi netleşmemiştir (Middeldorp ve Hol 2011).

GFAP yetişkin beynindeki ana IF proteinidir ve olgun astrositlerde karakteristik bir proteindir. Beyin hasarı veya CNS dejenerasyonu sırasında indüklendiği ve yaşlı beyinde daha yüksek oranda eksprese edildiği bilinen astrositlerin bir belirteci olarak kabul edilir. GFAP'nin başlangıçta astrosite özgü bir IF olduğu düşünülmekteydi (Eng ve ark 1971). Ancak birçok çalışma, enterik gliya ve Schwann hücreleri dahil olmak üzere periferik gliyada, gliyal olmayan ve hatta MSS'de olmayan hücrelerde immünositokimyasal olarak GFAP saptanmıştır. GFAP, ekspresyonu beyin hasarı ve hastalıkları gibi birçok faktör tarafından indüklenen yüksek düzeyde düzenlenmiş bir proteindir (Eng ve ark 2000). Astrositerin genişlemesi ve GFAP'nin artan ekspresyonu, beyin hasarı ve yaşlanma ile yüksek oranda ilişkili olan reaktif gliyozun bir göstergesidir. GFAP ekspresyonundaki değişiklikler, diğer hücre tiplerini ve beynin yapısını dolaylı olarak etkileyebilecek olan astrositlerin morfolojisini değiştirebilir (Middeldorp ve Hol 2011).

Geçmişteki ve günümüzdeki çoğu çalışma, astrositleri görselleştirmek için GFAP antikorlarını kullanır. Genel olarak, bir GFAP immün boyama, farklılaşmış astrositler için karakteristik olan yıldız şeklinde bir morfolojiye sahip hücreleri ortaya çıkarır. Astrositlerin yüksek büyütmeli görüntüleri GFAP immünoreaktivitesinin esas olarak perinükleer bölgede ve kalın uzantılarda mevcut olduğunu göstermiştir (Suzuki ve ark 2003, Middeldorp ve Hol 2011).

GFAP-/- farelerde serebral iskemiye yüksek duyarlılık tespit edilmiş bu da iskemik beyin hasarının ilerlemesinde astrositlerin ve GFAP'nin önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür (Nawashiro ve ark 1998). Genel olarak BOS'ta ve beyin dokusunda yüksek GFAP seviyeleri, beyin enfarktüsü, travmatik beyin hasarı gibi akut merkezi sinir sistemi hasarı durumlarında görülmüştür (Aurell ve ark 1991, Hausmann ve ark 2000).

1.9.3. Apopitoz Belirteçleri; TUNEL metodu ve Kaspazlar

Apopitoz ile ilgili bilgilerin zamanla artmasının bir sonucu olarak apopitoz tespit yöntemleri de zaman içinde gelişmiştir. Araştırmalar öncelikle morfolojik çalışmalarla başlamış, ardından DNA bozunma süreci, bazı biyokimyasal değişikliklerin tespiti, yapısal ve fonksiyonel değişiklikler için akış sitometrisi ve

nükleaz deneyleri takip etmiştir. Apopitoz ölçüm yöntemleri için farklı sınıflandırmalar yapılabilir (Obeng 2021):

- Morfolojik analizler
- Biyokimyasal analizler
  - Organellerde ve hücre zarındaki değişiklikler
  - DNA fragmantasyon analizi
  - Kaspaz aktivitesi

Morfolojik Analizler

Hematoksilen ve Eozinle boyanmış kesitlerin değerlendirilmesi, apopitotik hücrelerin tespitine izin vermesine rağmen, diğer yöntemlerle doğrulama gerekli olabilir. Apopitozun morfolojik olayları hızlı olduğundan ve hızlı bir şekilde fagosite edildiğinden, bazı dokularda histolojik olarak belirgin olmadan önce önemli apopitoz meydana gelebilir. Bu nedenle morfolojik yöntemler apopitozun geç dönem bulgularını saptarken, erken evredeki hücreleri saptayamaz (Elmore 2007). Ayrıca oldukça hızlı ve ucuz olmasına rağmen, nicel ölçüm açısından eksikliklere sahip olduğu bilinmektedir (Johnson ve ark 2000). Işık mikroskobu dışında floresan mikroskobu, elektron mikroskobu, faz kontrast mikroskobu da kullanılabilecek yöntemler arasında sayılabilse de çok sık tercih edilmez (Obeng 2021).

Biyokimyasal Analizler

DNA parçalanması, bazı organellerdeki değişiklikler, hücre zarı ve kaspaz aktivasyonu gibi değişiklikler immünohistokimyasal, immünolojik veya dizi-tabanlı yaklaşımlar kullanılarak analiz edilebilir.

Organellerde ve hücre zarındaki değişiklikler

Mitokondride membran geçirgenliğinin değişmesi gibi değişiklikler, apopitoza özgü değişikliklerin bir işareti olarak hizmet eder. Annexin V-FITC tahlili, FITC ile floresan işaretli örneğin ve bir floresan mikroskobu veya akım sitometrisi ile kullanılabilir (Koopman ve ark 1994). Bunlar dışında sitokrom C'nin Western Blot veya enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) ile tespiti de apopitoz tespiti için kullanılabilir (Obeng 2021).

Bunlar dışında plazma zarının geçirgenliğini ölçen radyoaktif ve radyoaktif olmayan testler ve mitokondrinin indirgeme kapasitesine dayalı kolorimetrik testler gibi sitotoksik testler de mevcuttur (Banfalvi 2014).

DNA fragmantasyon analizi

Apopitoz ve nekroz arasında ayrım yapmaya yardımcı olan bir yaklaşım da agaroz jel elektroforezidir, çünkü nekrozun sonuçları apopitozdaki gibi bir merdivenden ziyade jel üzerinde bir leke şeklinde görüntülenir (Rainaldi ve ark 2008). Uygulanması kolay bir yöntemdir, ancak yüksek sayıda apopitotik hücreye sahip dokular ve hücre kültürleri için yararlıdır, apopitotik hücre sayısının az olduğu durumlarda önerilmemektedir. Ayrıca DNA fragmantasyonu apopitozun geç evresinde meydana geldiğinden, bir DNA merdiveninin yokluğu, hücrelerin erken apopitoza girmiş olma potansiyelini ortadan kaldırmaz (Elmore 2007).

TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dNTP ucu etiketleme), 3-OH uçlarının etiketleyerek DNA kırıklarını belirlemenin başka bir yoludur ve dondurulmuş ve fikse edilmiş doku kesitlerinde analize izin verir. Biotin veya DIG gibi belirli nükleotidlerle DNA fragmanlarının terminal etiketlemesini içerir. Testler kit halinde mevcuttur ve ticari olarak temin edilebilir. Apopitoz için oldukça iyi bir belirteç olan TUNEL ayrıca çok hassastır. Floresan mikroskobu ile tek bir hücrenin veya akış sitometrisi yoluyla yaklaşık 100 kadar hücrenin saptanmasına izin verir. Aynı zamanda hızlı bir tekniktir ve 3 saatte tamamlanabilir. Dezavantajları ise maliyet ve bu yöntemle tespit için kaç DNA zinciri kopmasının gerekli olduğunun bilinmemesi sayılabilir (Elmore 2007, Obeng 2021).

Diğer bir yöntem, E-coli polimeraz ile etiketleme olabilir ancak kontaminasyon gibi durumlarda canlı ve nekrotik hücreler, yanlış pozitiflik gösterebilir. Hücre kültürlerinde, inter-nükleozomal DNA fragmantasyonu, enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) ile de tespit edilebilir (Obeng 2021).

Kaspaz aktivitesi

Normal şartlar altında apopitozun başlamasında tetikleyici bir molekül olan Apaf-1, Bcl2 ile bağlı durumda bulunduğu için apopitoz baskılanmış durumdadır. Hücre içi faktörlerin uyarımı sonucu, Sitokrom C'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-

9'u aktive eder ve apopitozom kompleksini meydana getirir. Aktive olan kaspaz-9 diğer kaspazların aktivasyonunu başlatır (Adams 2003, Elmore 2007). Dolayısıyla kaspaz aktivasyonu apopitozun bir belirteci olarak değerlendirilmektedir.

Kaspaz aktivasyonu, Western Blot, immünopresipitasyon ve immünohistokimya dahil olmak üzere çeşitli şekillerde tespit edilebilir. Hem poliklonal hem de monoklonal antikorlar, pro-kaspazlar ve aktif kaspazlar için mevcuttur. Dezavantajı, kaspaz aktivasyonunun mutlaka apopitozun gerçekleştiğini göstermemesidir (Elmore 2007, Obeng 2021).

Kaspaz-3, hem ekstrinsik yol üzerinden Kaspaz-8 ile aktive edilebildiği gibi intrinsik-mitokondriyal yolda oluşan apopitozom üzerinden Kaspaz 9 ile de aktive edilebilir (Broughton ve ark 2009). Kaspazların ve özellikle de kaspaz 3'ün olarak değerlendirilmesi apopitoz değerlendirilmesinde sıkça başvurulan bir yöntemdir (Fabres ve ark 2020, Liu ve ark 2020, Dasdelen ve ark 2021).

1.9.4. TAS, TOS ve OSI

İnflamatuar yanıt esnasında üretilen oksidanlar hedef proteinlerle reaksiyona girerler veya farklı antioksidan sistemler tarafından nötralize edilirler (Zhang ve ark 2016). Çoğu oksidanın yarı ömrü oldukça kısadır, bu nedenle oksidasyon ürünlerinin ölçümü oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir (Palmieri ve Sblendorio 2007). Oksidasyon ürünlerinin tek tek ölçümlerinin yanı sıra, toplam oksidatif durumunu ölçen bir test geliştirilmiştir. Toplam oksidan seviyesi (TOS) olarak isimlendirilen bu yöntem genellikle vücudun genel oksidasyon durumunu tahmin etmek için kullanılır.

Farklı antioksidan moleküllerin serum (veya plazma) konsantrasyonlarının ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmadığından ve antioksidan etkileri katkılı olduğundan bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi ölçülür ve buna toplam antioksidan seviye (TAS) denir (Miller ve ark 1993). Toplam antioksidan kapasite, toplam antioksidan aktivite, toplam antioksidan gücü veya toplam antioksidan durumu gibi isimlendirmeler de kullanılmaktadır (Erel 2004). Total Antioksidan Seviye (TAS) analizleri antioksidan enzimlerin ve metal bağlayıcı proteinlerin katkısını ölçmez, ağırlıklı olarak düşük moleküler ağırlıklı, zincir kıran antioksidanları ölçer. Biyolojik sıvılar, zincir kırıcı antioksidan aktiviteye sahip çok sayıda bileşik içerir. Bunların

başlıcaları sulu fazda ürat, askorbat, bilirubin ve tiyoller ve lipid fazında á-tokoferol, karotenoidler ve flavonoidler olarak sayılabilir. Ek olarak, normalde antioksidan olarak ölçülmeyen birçok başka bileşik, bir miktar zincir kırıcı antioksidan aktiviteye sahiptir. Genel olarak, oksidatif stres ile ilişkili durumlarda TAS azalır ve zincir kırıcı antioksidanların uygulanması antioksidan kapasiteyi arttırır (Young 2001).

TAS ve TOS'un ölçümlerinin yanı sıra TOS değerinin TAS değerine oranlanmasıyla elde edilen oksidatif stres indeksi (OSI) de vücutta genel oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılabilen birer oksidatif stres parametresidir (Wu ve ark 2017).

1.9.5. Yeni Bir Belirteç Olarak Trimetilamin N oksit (TMAO)

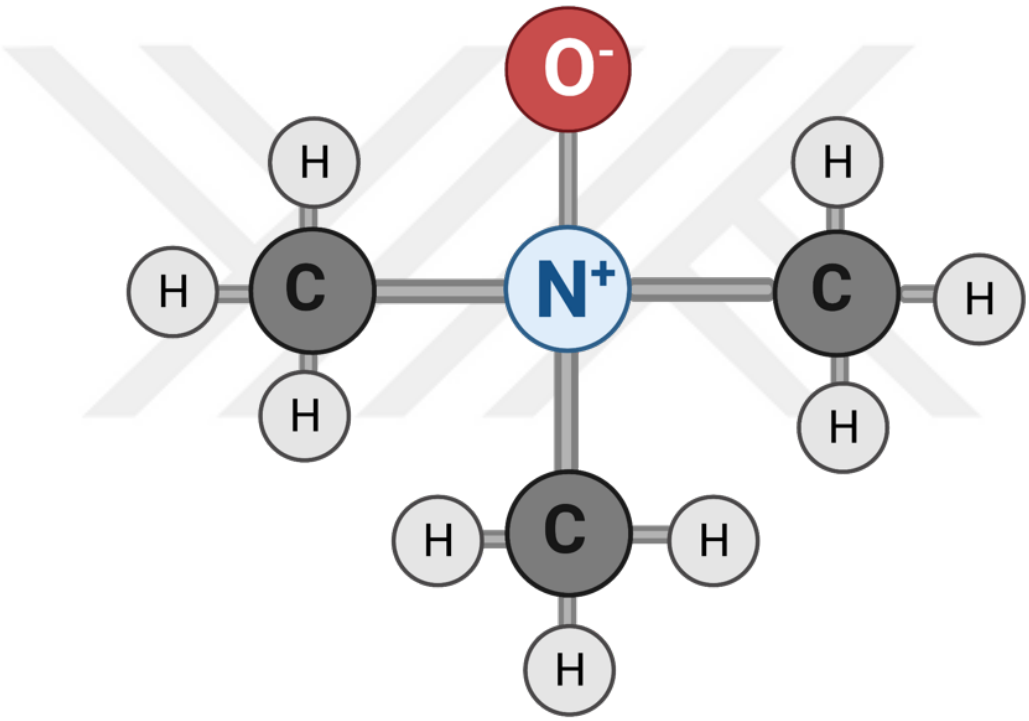
Trimetilaminin (TMA) oksijenli ürünü olan Trimetilamin N oksit **(**TMAO), amin oksitler sınıfına aittir (Ufnal ve ark 2015). Bağırsaktaki bakteriler tarafından kolin ve L karnitinin metabolizmasından elde edilen TMA'nın büyük bir kısmı emilir ve dolaşıma karışır. Daha sonra TMA, hepatik bir enzim olan flavin içeren monooksijenaz-3 (FMO3) tarafından hızla TMAO'ya oksitlenir (Zeisel 1981, Zeisel ve ark 1983, Wang ve ark 2011). Çoğunlukla TMAO'nun %50'si metabolize olmaz ve değişmeden 24 saat içinde idrar, ter ve nefes yoluyla atılır (Ayesh ve ark 1993, Smith ve ark 1994). Kalan TMAO, insan bağırsağında bakteriyel TMAO redüktaz tarafından TMA'ya indirgenir (Fennema ve ark 2016). Normal sağlıklı bireylerde sistemik TMAO konsantrasyonu 0,5-5 μM arasında değişmektedir. Kemirgenlerde de benzer seviyeler bildirilmiştir (Smith ve ark 1994, Wang ve ark 2011, Ufnal ve ark 2015). TMAO'nun yapısal formülü Şekil 1.13'te gösterilmiştir.

TMAO'nun MSS'deki rolü yeterince araştırılmamıştır. Plazma TMAO seviyeleri ile beyin hastalıkları arasındaki ilişkiyi gösteren çok az çalışma vardır (Subramaniam ve Fletcher 2018). Bir çalışmada yüksek TMAO düzeylerinin, claudin-5 ve zonula oklüdens (ZO) gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak kan beyin bariyerinin bozulması yoluyla inme sonrası hastalarda serebral küçük damar disfonksiyonunun ilerlemesine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Liu ve Huang 2015). Başka bir çalışma ise TMAO'nun koroid pleksusta organik anyon taşınmasının stres kaynaklı değişimini baskıladığını göstermiştir (Villalobos ve Renfro 2007).

Alzheimer hastalığında beyin-bağırsak mikrobiyom bağlantılarını değerlendirmek için Xu ve Wang, tüm insan mikrobiyal metabolitleri ve genetik

hastalıklar arasındaki genetik etkileşimleri modellemek için ağ tabanlı yeni bir yaklaşım geliştirdi. Bu entegre hesaplama yaklaşımı, TMAO ve Alzheimer arasında güçlü bir pozitif korelasyon gösterdi (Xu ve Wang 2016)

Bir başka çalışma daha yüksek TMAO seviyeleri, artan inme riski ve daha kötü nörolojik defisit ile ilişkili olduğu, TMAO'yu artıran kronik diyet maruziyetlerinin iskemik inmeye doğrudan katkıda bulunabileceğini bildirmiştir (Rexidamu ve ark 2019). Ayrıca plazma TMAO seviyelerinin, tekrarlanan serebral İ/R'ye maruz kalan farelerde yükseldiği bildirilmiştir (Liu ve ark 2020).



Şekil 1.13. TMAO yapısal formülü (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

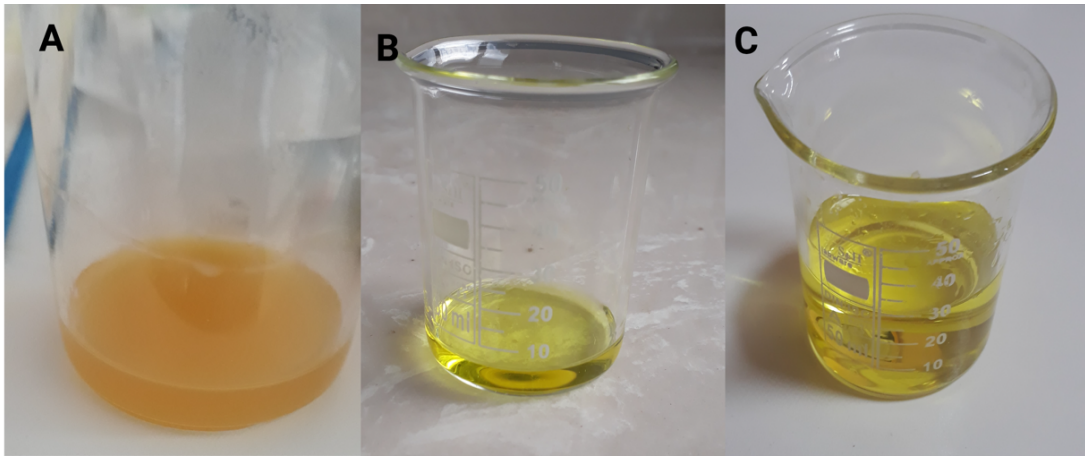
2.1. Deney Hayvanları

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nda alınan 28.08.2020 tarih ve 2020-34 numaralı kurul izni ile gerçekleştirildi. Çalışmadaki histolojik değerlendirmeler Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, biyokimyasal analizler ise Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada ortalama ağırlıkları 344,33 (300–400 gr) olan, 55 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Deney süresince tüm sıçanların bakımı Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu hayvan bakım yönergelerine uygun olarak yapıldı.

2.2. Timokinon ve Silimarinin Hazırlanması

Timokinon (15039, Cayman Chemical, USA) TİR ve STİR grubuna %5 tween 20 ve etanol içerisinde 16 mg/ml konsantrasyonda çözdürüldükten sonra distile su ile dilüe edilerek 3mg/kg/gün ip olarak uygulandı. Dozlar günlük olarak karanlıkta hazırlandı ve ışıktan korundu.

Silimarin (S0292, Sigma-Aldrich, USA) SİR ve STİR Grubuna %5 tween 20 içerisinde çözdürdükten sonra etanol/distile su (1:1) ile dilüe edilerek 200 mg/kg/gün ip olarak uygulandı. Dozlar haftalık olarak hazırlandı ve -18°C'de saklandı. Şekil 2.1'de hazırlanmış Silimarin, Timokinon, Silimarin+Timokinon dozları görülmektedir.



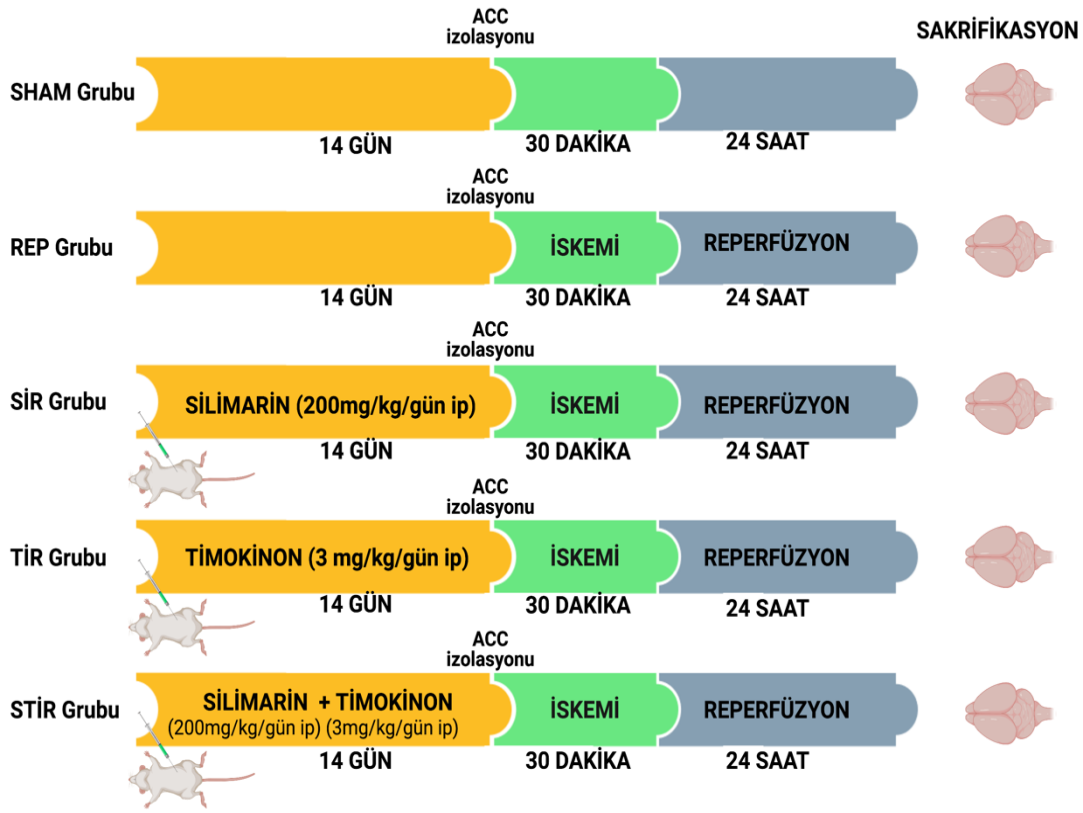
Şekil 2.1. A: Silimarin, **B:** Timokinon, **C:** Silimarin + Timokinon.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Cerrahi Prosedür

55 adet Wistar-albino sıçan rastgele olarak gruplandırıldı:

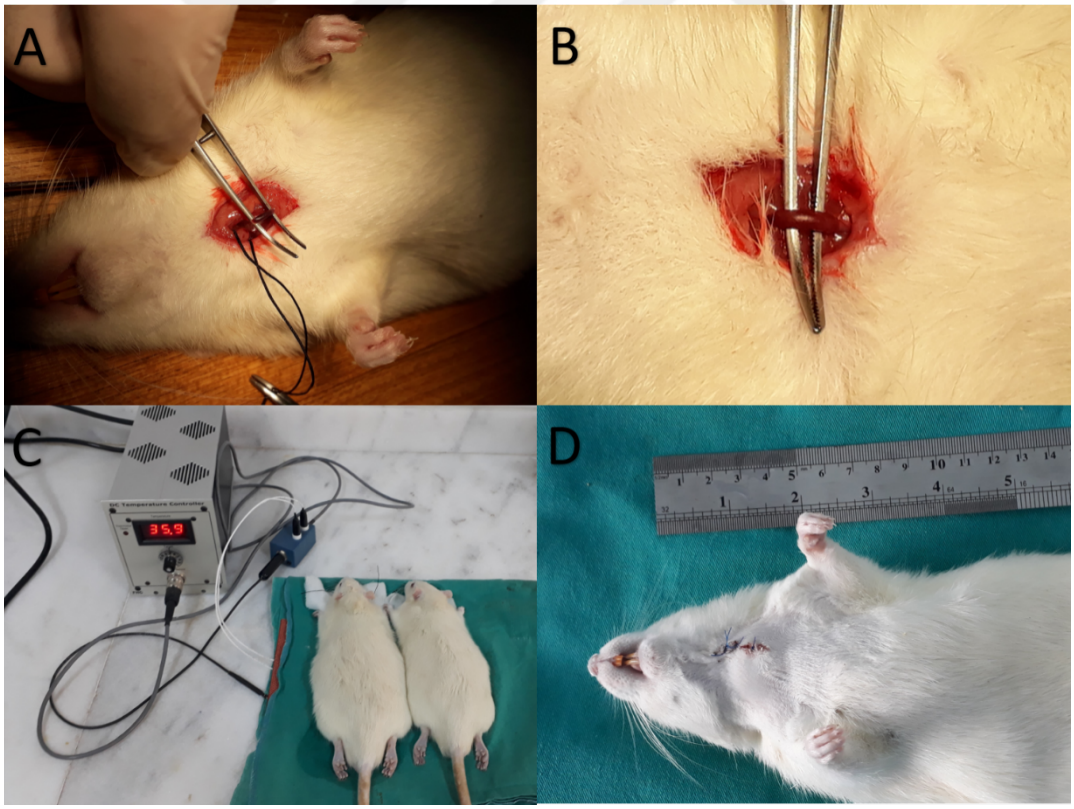
- Sham Kontrol (SHAM) grubu: (n=7)
- İskemi-reperfüzyon (REP) grubu: (n=12)
- Silimarin (14 gün) + İskemi-Reperfüzyon (SİR) grubu (n=12)
- Timokinon (14 gün) + İskemi-Reperfüzyon (TİR) grubu (n=12)
- Silimarin + Timokinon (14 gün) + İskemi-Reperfüzyon (STİR) grubu (n=12)

SİR grubuna 200 mg/kg/gün silimarin, TİR grubuna 3 mg/kg/gün timokinon ve STİR grubuna da 200 mg/kg/gün silimarin + 3 mg/kg/gün timokinon ip olarak 14 gün boyunca verildi. 14 günün sonunda BCCAO iskemi reperfüzyon modeli uygulandı. REP grubuna ve SHAM grubuna herhangi bir ilaç uygulanmadı. Oluşturulan deney grupları ve yapılan işlemler Şekil 2.2.'de ayrıntılı olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Deney gruplarının oluşturulması (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) ile anestezi uygulanan sıçanlar operasyon masasına sırtüstü yerleştirilip bacakları bez bant yardımı ile sabitlendi. Hayvanın boynunda orta hatta yaklaşık 3 cm'lik ventral insizyon yapılarak sağ ve sol karotid arterler etraflarındaki dokulardan ve özellikle *N. Vagus*'tan dikkatlice izole edildi (Şekil 2.3.A, B). SHAM grubunda bilateral *A. Carotis communis*'ler izole edildi, pulsasyon izlendi ve ligasyon yapılmadan insizyon 3 adet düz sütür ile kapatıldı. Diğer gruplarda serebral iskemiyi oluşturmak için iki damar oklüzyon modeli kullanıldı. Bilateral *A. Carotis communis'ler* izole edilip pulsasyon izlendi ve 3.0 ipek iplikle ligasyon yapıldı. İskeminin oluştuğu görsel olarak teyit edilip 30 dk bekletildi. İskemi süresince ratların vücut sıcaklığı hemotermik battaniye (Şekil 2.3.C) yardımıyla 37˚C'de sabit tutuldu. İskemi sonrasında ipler çözülerek kan akımının başladığı yine görsel olarak doğrulandı. İnsizyon kapatılarak sıçanlar 24 saat gözlem altında tutuldu (Şekil 2.3.D).



Şekil 2.3. A ve **B:** izole edilmiş A. Carotis Communis, **C:** İzotermik battaniye ile vücut ısısı korunan denekler, **D:** İnsizyonu 3 adet sütür ile kapatılmış denek.

2.4. Nörolojik Muayene Skorlaması

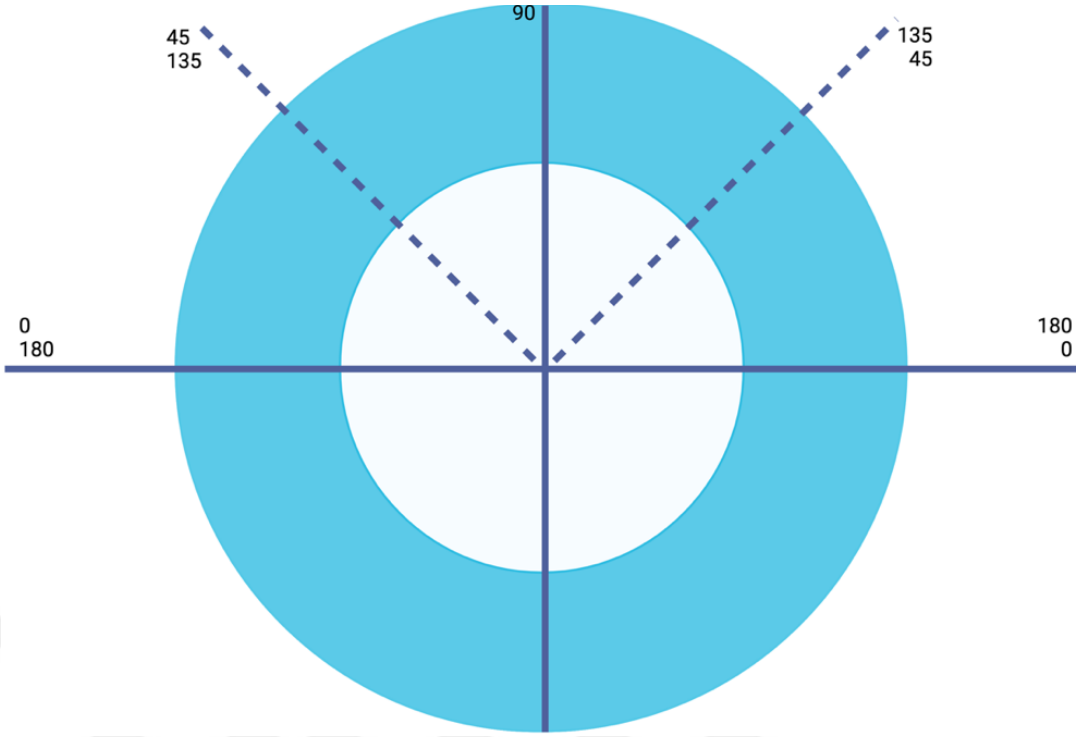
24 saatin sonunda; deneklerin nörolojik durumlarının değerlendirilmesi için Toklu'nun modifiye nörolojik muayene skorlaması uygulandı (Toklu ve ark 2019). Hayvanlar bilinç, yürüme-duruş, tırmanma platformu, rotasyon testi ve nosiseptif uyaranlara yanıt yönünden aynı gözlemci tarafından puanlandırıldı. Bu skorlamaya göre artmış skor artmış nörolojik hasarı göstermektedir (Tablo 2.1).

Yürüme-duruş için sıçanlar kafeslerinde hareket ederken gözlenirken nosiseptif uyaranlara tepkileri, kuyruk sıkıştırılarak değerlendirilir. Eğik düzlem, hayvanın vücut pozisyonunu, yani denge ve dengeyi koruma yeteneğini değerlendirir. Ahşap platformun boyutları 75x15x1cm ölçülerindedir (Şekil 2.5). Platform 45°'lik açıyla yerleştirilir. Sıçanlar platformun ortasına yerleştirilir ve dengelerini koruma yetenekleri ve tırmanma davranışları değerlendirilir. Normal sıçanlar platforma kolayca tırmanırken, ciddi şekilde yaralanan sıçanlar platformdan aşağı kayar. Rotasyon/döndürme testi ise denge eksikliklerinin ve hemiplejinin tespiti etmek için kullanılır. Şekil 2.4'de gösterilen çizim A4 boyutundaki kâğıda basılır. Sıçanlar kuyruklarından tutularak, 1 m yükseklikte asılı kalır ve ön ayakların fleksiyonu gözlemlenir. Normal farelerin her iki ön ayağını da yere doğru uzatması beklenir. Hasar durumunda ise fleksiyon gözlemlenir.

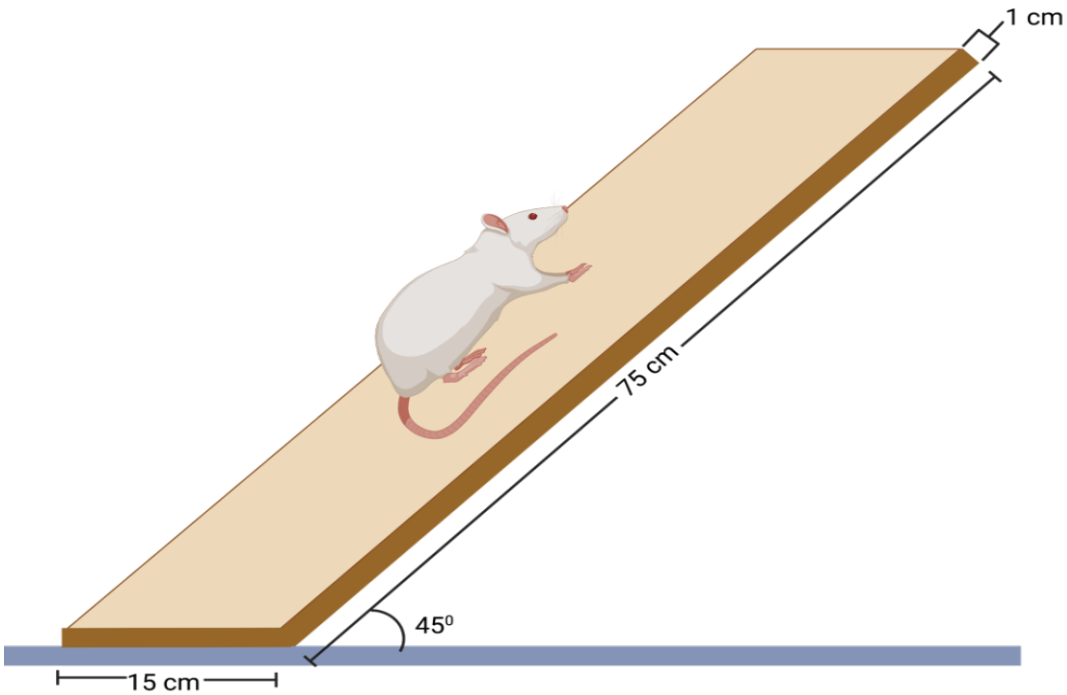
2.5. Doku ve Kanların Temini ve Saklanması

Nörolojik muayeneleri tamamlanan hayvanlar 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) ile anestezi altında intrakardiyak olarak kanları alınarak sakrifiye edildi. Serebrum ve serebellum dokuları alınarak PBS içinde %4'lük parafolmaldehit içine doku fiksatif oranı 1/10 olacak şekilde alınarak +4ºC'de 24 saat ile fikse edildi. Daha sonra dokular %30'luk Sükroz'a alındı.

İntrakardiyak olarak alınan sarı kapaklı jelli tüplere alınarak 5-6 kez altüst edildi. Kanlar bekletilmeden 3.000 rpm 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Numuneler çalışılana kadar -80 ºC'de saklandı.



Şekil 2.4. Döndürme testi açı ölçümü için çizim. Sıçanlar kuyruklarından tutularak, 1 m yükseklikte asılı kalır ve ön ayakların fleksiyonu gözlemlenir (BioRender.com ile oluşturulmuştur).



Şekil 2.5. Tırmanma testi için eğimli ahşam platform düzeneği (75 x 15 x 1 cm) (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Tablo 2.1. Toklu'nun Modifiye Nörolojik Muayene Skoru.

Bilinç	Normal	**0**
	Ajitasyon	**1**
	Letarji	**2**
	Stupor	**3**
	Koma	**4**
Yürüme duruş	Normal	**0**
	Ekstremite addüksiyonu	**1**
	Hipomobilite	**2**
	Paretik tarafa dönersek	**3**
	Kendiliğinden çember	**4**
	Postüral refleks yok	**5**
Tırmanma platformu	Tırmanma	**0**
	Arka bacaklarda kalmak	**1**
	> 5 s için asılı	**2**
	<5 s için asılı	**3**
	Yakalama refleksi yok	**4**
Rotasyon testi	> 1 saniye 180	**0**
	<1 saniye 180	**1**
	1–3 s 90	**2**
	<1 s 90	**3**
	1–3 sn 45	**4**
	<1 s 45	**5**
Nosiseptif uyarana yanıt	Nosiseptif uyarana normal yanıt	**0**
	Nosiseptif uyarana karşı hipoaktif	**1**
TOPLAM		**20**

2.6. Histolojik Çalışmalar

Taze hazırlanmış ve soğutulmuş %4'lük parafolmaldehit ile fiksatif/doku oranı 10/1 olacak şekilde +4ºC'de 24 saat fikse edilen dokular %30'luk sükroz içerisine alınarak doku dibe çökene kadar -en az 24 saat- bekletildi. Dokular kriyomatriks içine gömülerek kriyostat cihazı (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 μm kalınlığında seri kesitler alındı.

2.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyama

İnflamasyon, kanama, nöron dejenerasyonu tespiti ve genel histolojik değerlendirme için her denekten rastgele seçilen kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanarak incelendi. H&E boyama Tablo 2.2.'deki protokole göre yapıldı.

H&E boyası ile histolojik incelemede apopitotik hücreler, koyu eozinofilik sitoplazması olan ve nükleer kromatin parçaları içeren yuvarlak/oval hücreler şeklinde izlenir (Elmore 2007). Hasarlanan nöronlarda asidofilik nöronal sitoplazma, piknoz ve karyoreksis ile karakterize histomorfolojik görünüm "kırmızı nöronlar" izlenir (Ellison 2004). Her denekten boyanan frontal korteks ve serebellum kesitleri dejeneratif/kırmızı nöronlar, doku bütünlüğü, ödem, inflamasyon, kanama yönünden değerlendirildi.

2.6.2. Toluidine Blue Boyama

İnflamasyon, kanama, iskemi, nöron dejenerasyonu, demiyelinizasyon tespiti ve genel histolojik değerlendirme için her denekten rastgele seçilen kesitler Toluidine Blue (TB) ile boyanarak incelendi. TB boyama Tablo2.3.'deki protokole göre yapıldı. Her denekten boyanan frontal korteks ve serebellum kesitleri dejeneratif nöronlar, hücrelerde piknozis ve karyoreksis, doku bütünlüğü, ödem, inflamasyon, kanama yönünden değerlendirildi.

Tablo 2.2. Frozen kesitler için H&E protokolü.

FROZEN KESİTLER İÇİN H&E PROTOKOLÜ

1	%99,9 Absolü alkol 5 sn (2x)
2	Çeşme suyu 5 sn
3	Harris Hematoksilen 2 dk
4	Çeşme suyu 5 sn (2x)
5	%99,9 Absolü alkol 5 sn
6	Eozin 1 dk
7	Çeşme suyu 5 sn (2x)
8	%99,9 Absolü alkol 5 sn (3x)
9	Ksilen 5sn (2x)
10	Entellan ile kapatma

Tablo 2.3. Frozen kesitler için TB protokolü.

FROZEN KESİTLER İÇİN TOLUİDİNE BLUE PROTOKOLÜ

1	%99,9 Absolü alkol 5 sn (2x)
2	Çeşme suyu 5 sn
3	Lamlar ısıtma tablasında ısıtılır (1dk)
4	Toluidine Blue dokuyu kapatacak kadar damlatılır (ısıtma tablasında)
5	Boyanın kenarında renk halesi oluşana kadar beklenir (2dk)
6	Çeşme suyu 5 sn (2x)
7	%99,9 Absolü alkol 5 sn (3x)
8	Ksilen 5sn (2x)
9	Entellan ile kapatma

2.6.3. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Anti-GFAP antikor işaretleme

Kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 µm kalınlığında alınan Serebral frontal korteks ve serebellum kesitleri konjuge Alexa Fluor® 488 anti-GFAP Antikoru (644704 Biolegend, USA) ile işaretlendi. Uygulanan protokol Tablo2.4.'de özetlenmiştir.

İşlemler karanlık ortamda nem odası oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler floresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede frontal korteks preparatlarından rastgele 6 alan serebellum preparatlarından beyaz cevher, granüler tabaka ve moleküler tabaka bölümlerinin her birinden rastgele 4'er alan seçilerek DP72 kamera ile kaydedildi. Kaydedilen görüntülerde GFAP işaretli alanın total alana oranı Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2.4. Konjuge anti-GFAP antikoru işaretleme protokolü.

KONJUGE ANTİ-GFAP ANTİKORU İŞARETLEME PROTOKOLÜ

1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 2x5dk yıkandı.
3	Oda sıcaklığında 30 dk %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile inkübe edildi.
4	PBS ile 2x5dk yıkandı.
5	Protein Block (Ab 64226, Abcam, UK) solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
7	Alexa Fluor® 488 anti-GFAP (644704 Biolegend, USA) (1/200 dilüe edilmiş) antikoru ile 24 saat, +4°C'de muamele edildi.
8	PBS ile 3x5dk yıkandı.
9	Kesitler DAPI'li flüoresan kapatma medyumu (Fluoroshield with DAPI, F6057, Sigma-Aldrich, USA) ile kapatıldı.

Anti-Kaspaz 3 antikor işaretleme

Kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 µm kalınlığında alınan serebrum frontal korteks kesitleri anti kaspaz-3 antikoru (Anti-Caspase-3 antibody, ab4051, Abcam, United Kingdom) ile işaretlendi. Uygulanan protokol Tablo2.5.'de özetlendi. İşlemler karanlık ortamda nem ortamı oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler floresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede frontal korteks preparatlarından rastgele 4'er alan seçilerek DP72 kamera ile kaydedildi. Kaydedilen görüntülerde Kaspaz 3 işaretli hücreler ve DAPI işaretli hücreler Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak sayıldı ve oranlandı.

Tablo 2.5. Anti kaspaz-3 işaretleme protokolü.

ANTİ KASPAZ-3 İŞARETLEME PROTOKOLÜ

	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
1	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
2	Oda sıcaklığında 30 dk %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile inkübe edildi.
3	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
4	Protein Block (64226, Abcam, UK) solüsyonu ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
6	Anti Kaspaz-3 (Anti-Caspase-3 antibody, ab4051, Abcam, United Kingdom) (1/100 dilüe edilmiş) primer antikoru ile 1 gece +4°C'de inkübe edildi.
7	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
8	TRITC Goat Anti-Rabbit (Ig G) Secondary Antibody (Abcam ab6718, Cambridge, UK) sekonder antikor ile 3 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
9	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
10	Kesitler DAPI'li flüoresan kapatma medyumu (Fluoroshield with DAPI, F6057, Sigma-Aldrich, USA) ile kapatıldı.

2.6.4. TUNEL Metodu

TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit (ABP Biosciences, Cat No. a050, Lot No. AB2150A2) ile protokole uygun olarak işaretlendi. Pozitif ve negatif kontroller de protokolde belirtildiği gibi yapıldı. Uygulanan protokol Tablo 2.6.'da kısaca özetlenmiştir. İşlemler karanlık ortamda nem odası oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler floresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede frontal korteks preparatlarından rastgele 6'şar alan serebellum preparatlarından rastgele 4'er alan seçilerek DP72 kamera ile kaydedildi. Kaydedilen görüntülerde TUNEL işaretli hücreler ve DAPI işaretli hücreler Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak sayıldı ve apopitotik indeks (AI) "toplam apopitotik hücre/toplam hücre X 100" formülüne göre hesaplandı.

Tablo 2.6. TUNEL protokolü.

	TUNEL PROTOKOLÜ
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
3	Oda sıcaklığında 30 dk %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile inkübe edildi.
4	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
5	Oda sıcaklığında 30 dk proteinaz K solüsyonu inkübe edildi.
6	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
Pozitif kontrol için (7, 8, 9. Basamaklar uygulandı.)	
7	Örnekler DNAase I tamponu ile 10 dk inkübe edildi.
8	DNAase I solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
9	Deiyonize su ile bir kez yıkandı.
TUNEL REAKSİYONU	
10	Örnekler TdT reaksiyon tamponu ile 10 dk inkübe edildi.
11	Taze hazırlanmış TdT reaksiyon kokteyli ile 37ºC'de 2 saat inkübe edildi.
Negatif kontrol örneklerine, 11. basamak yerine TdT enzim içermeyen 50 µl	
12	%3 BSA'lı PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
13	Andy FluorTM 488-Streptavidin solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
14	%3 BSA'lı PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
15	Kesitler DAPI'li flüoresan kapatma medyumu (Fluoroshield with DAPI, F6057, Sigma-Aldrich, USA) ile kapatıldı.

2.7. Biyokimyasal Çalışmalar

2.7.1. Serum Total Oksidan ve Antioksidan Seviye Ölçümü

TAS ve TOS analizleri, TAS (RL0017), TOS (RL0024) Rel Assay Diagnostics (Turkey) marka ticari kitler kullanılarak Beckman Coulter AU5800 Series (Japan) cihazıda çalışılmak üzere aplike edildi. Aplikasyon işlemlerinden sonra Rel Assay Diagnostics (Turkey) marka kitler kullanılarak otoanalizörde fotometrik yöntemle ölçüldü. TAS ve TOS'un birimlerinin benzer olması sağlandı.

2.7.2. Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif yükün göstergesi olan Oksidatif Stres İndeksi (OSI) değeri TAS ve TOS değerlerinin % oranı olarak kabul edildi. OSI değeri:

OSI = [TOS (μmol H_2O_2/L) /TAS (μmol Trolox equivalent/L)] X 100 formülüne göre hesaplandı.

2.7.3. Trimetilamin *N*-oksit (TMAO)

Döteryumlu Trimetilamin-N-oksit (d9-TMAO), Cambridge Isotope Laboratories'den (Catalog: DLM-4779-1), diğer tüm reaktifler, Sigma-Aldrich'den temin edildi. Çalışma, Liam M. Heaney ve arkadaşlarının çalışması modifiye edilerek gerçekleştirildi (Heaney ve ark 2016).

Analizler için önceden hazırlanmış plazma örnekleri oda ısısında çözdürüldükten sonra Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi kütle spektrometri (LC-MS/MS) cihazında C18 HPLC kolon kullanılarak Turbo Ion Spray Elektrospray (ESI) kaynaklı pozitif modda çalışıldı. Analiz sırasında iki mobil faz kullanıldı. A pompasında asit içeren sıvı faz ile, B pompasında formik asit +alkol içeren faz oluşturuldu. Serum örnekleri ependorf tüplere 250 μL olacak şekilde pipetlendi. Üzerine TMAO'nun izotopu olan, d9 dan 100 μL internal standart olarak eklendi. Serumdan proteinleri ayrıştırmak için denatürasyon işlemi yapıldı. Bunun için d9 izotop eklenmiş örneğe 1.000 μL alkol ilave edildi. Alkol ilave edildikten sonra numuneler önce 30 saniye vortekslenip daha sonra santrifüj edildi. Daha sonra tüplerden supernatant kısmı alınarak başka tüplere aktarıldı. Tüplerdeki sıvı azot gazı altında uçuruldu. Uçurma işlemi sonrası tüplere 250 μL çözücü ilave edilerek

vortekslendi. Çözünen numuneler HPLC viallere konarak, viallerin kapakları kapatıldı ve otosamplere yerleştirilerek analiz için HPLC aracılığı cihaza enjekte edildi. Sonuçlar, LC-MS/MS cihazının Analyst Software sisteminden elde edildi.

2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizler SPSS 21.0 istatistik paket programında gerçekleştirildi. Veriler ortalama ve standard sapma şeklinde ifade edildi. Sayısal ölçülen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile analiz edildi. Sayısal ölçülen ve normal dağılım gösteren değişkenler için parametrik testler, diğer değişkenler için parametrik olmayan testler kullanıldı. Normal dağılım gösteren ve sayısal olarak ölçülen değişkenlerin varyansalarının homojenliği Levene testi ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi ile test edildi; grupların ikili karşılaştırmaları için varyanslar homojen ise Tukey's HSD testi, varyanslar homojen değilse Tamhane's T2 testi kullanıldı. $P<0.05$ olasılık değeri anlamlı olarak kabul edildi.

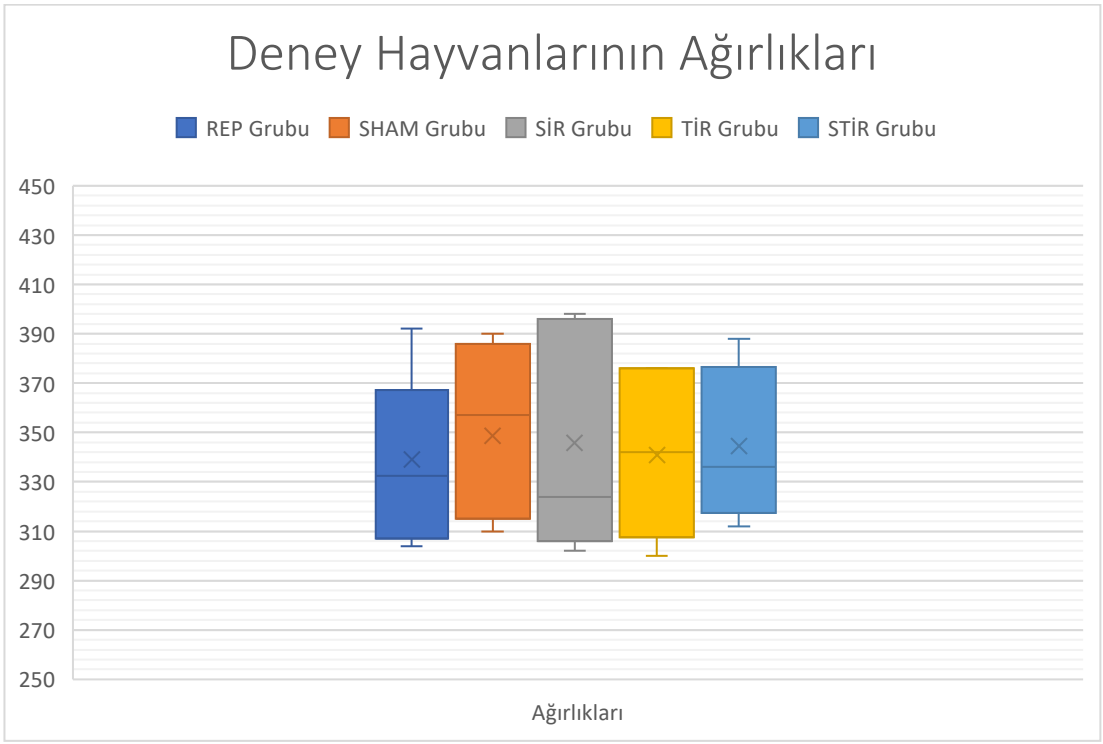
3. BULGULAR

Sham grubunda 7, diğer gruplarda 12 denek içeren 5 grupta toplamda 55 rat çalışmaya alındı. Deneklerin 6 tanesi işlemler sırasında kaybedildi. Çalışma 49 denek ile tamamlandı. Deney sürecinde 2 denekte ek anestezi uygulandı ve ek anestezi uygulanan deneklerden kayıp olmadı. Deney hayvanlarının ağırlık ortalamalarının birbirine yakın olduğu ve gruplar arasında fark olmadığı saptandı (p>0.05, Grafik 3.1., Tablo 3.1., Tablo 3.2.)

Tablo 3.1. Deney hayvanlarının ağırlıkları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	339,0833	33,22228	9,59045	317,9749	360,1918
SHAM grubu	7	348,5714	33,66431	12,72391	317,4371	379,7057
SİR grubu	9	342,4444	41,37364	13,79121	310,6419	374,2470
TİR grubu	11	348,0000	28,39718	8,56207	328,9225	367,0775
STİR grubu	10	344,6000	29,45505	9,31450	323,5291	365,6709
Total	49	344,1837	31,99718	4,57103	334,9930	353,3743

ANOVA sonucu: p=0.965



Grafik 3.1. Deney hayvanlarının ağırlıkları.

Tablo 3.2. Deney hayvanlarının ağırlıkları Tukey's-Hsd sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	-9,48810	15,93344	1,000
	SİR grubu	-3,36111	16,79804	1,000
	TİR grubu	-8,91667	12,85635	,999
	STİR grubu	-5,51667	13,36924	1,000
SHAM grubu	**REP grubu**	9,48810	15,93344	1,000
	SİR grubu	6,12698	18,76421	1,000
	TİR grubu	,57143	15,33646	1,000
	STİR grubu	3,97143	15,76889	1,000
SİR grubu	**REP grubu**	3,36111	16,79804	1,000
	SHAM grubu	-6,12698	18,76421	1,000
	TİR grubu	-5,55556	16,23289	1,000
	STİR grubu	-2,15556	16,64204	1,000
TİR grubu	**REP grubu**	8,91667	12,85635	,999
	SHAM grubu	-,57143	15,33646	1,000
	SİR grubu	5,55556	16,23289	1,000
	STİR grubu	3,40000	12,65184	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	5,51667	13,36924	1,000
	SHAM grubu	-3,97143	15,76889	1,000
	SİR grubu	2,15556	16,64204	1,000
	TİR grubu	-3,40000	12,65184	1,000

(*p<0,05)

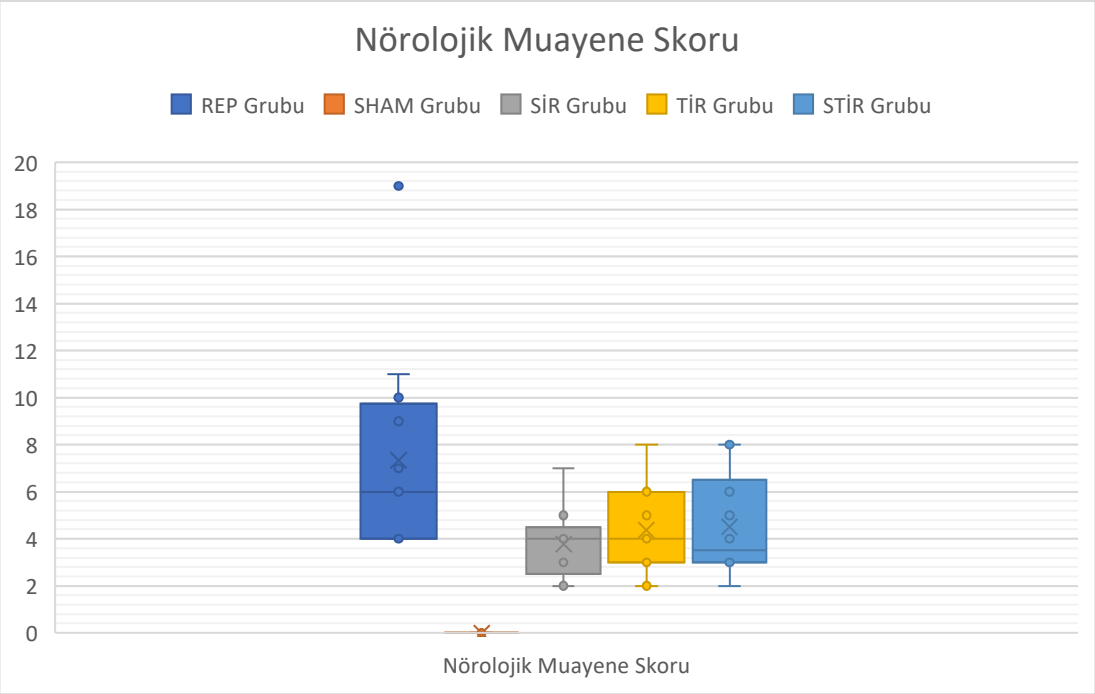
3.1. Nörolojik Muayene Sonuçları

Nörolojik muayene skorlarının istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 3.3. ve Grafik 3.2.'de, gruplar arası farklar Tablo 3.4.'de özetlenmiştir. SHAM grubu diğer en düşük değerlere sahipti (p=0.01). SİR, TİR ve STİR gruplarının skorları REP grubundan düşük olmakla birlikte aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 3.3. Nörolojik muayene skorları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	7,3333	4,45856	1,28708	4,5005	10,1662
SHAM grubu	7	0,0000	0,00000	0,00000	0,0000	0,0000
SİR grubu	9	3,7778	1,56347	0,52116	2,5760	4,9796
TİR grubu	11	4,3636	1,85864	0,56040	3,1150	5,6123
STİR grubu	10	4,5000	2,17307	0,68718	2,9455	6,0545
TOTAL	49	4,3878	3,40842	0,48692	3,4087	5,3668

ANOVA sonucu: p=0.001



Grafik 3.2. Nörolojik muayene skorları.

Tablo 3.4. Nörolojik muayene skorları Tamhane's-T2 testi sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	7,33333*	1,28708	0,001
	SİR grubu	3,55556	1,38859	0,202
	TİR grubu	2,96970	1,40379	0,411
	STİR grubu	2,83333	1,45904	0,513
SHAM grubu	**REP grubu**	-7,33333*	1,28708	0,001
	SİR grubu	-3,77778*	0,52116	0,001
	TİR grubu	-4,36364*	0,56040	0,000
	STİR grubu	-4,50000*	0,68718	0,001
SİR grubu	**REP grubu**	-3,55556	1,38859	0,202
	SHAM grubu	3,77778*	0,52116	0,001
	TİR grubu	-0,58586	0,76528	0,998
	STİR grubu	-0,72222	0,86245	0,995
TİR grubu	**REP grubu**	-2,96970	1,40379	0,411
	SHAM grubu	4,36364*	0,56040	0,000
	SİR grubu	0,58586	0,76528	0,998
	STİR grubu	-0,13636	0,88672	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	-2,83333	1,45904	0,513
	SHAM grubu	4,50000*	0,68718	0,001
	SİR grubu	0,72222	0,86245	0,995
	TİR grubu	0,13636	0,88672	1,000

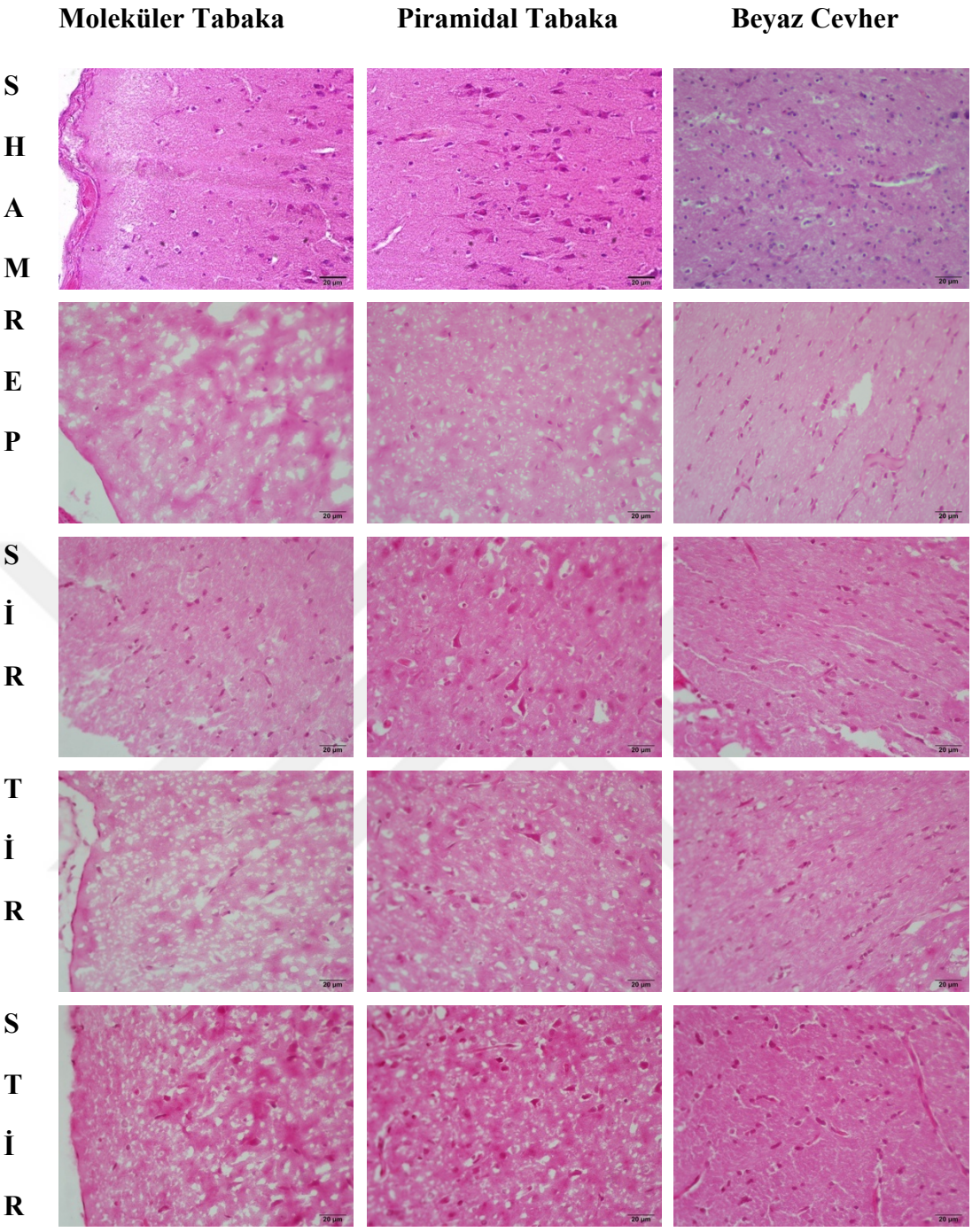
(*p<0,05)

3.2. Histolojik Bulgular

3.2.1. Hematoksilen& Eozin Sonuçları

H&E boyanan serebrum frontal korteks ve serebellum kesitleri incelendi. Serebrum frontal korteks kesitlerinde gri cevher ve beyaz cevher incelendi; SHAM grubunda sağlıklı nöron ve gliyalar, düzgün bir doku mimarisi izlendi. REP grubunda özellikle gri cevherde özellikle moleküler tabakada doku bütünlüğünde bozulma ve şiddetli ödem ve artmış vakuoller görüldü. Piramidal tabakada en belirgin olacak şekilde bazı hücrelerde eozinofilide artış, büzüşme, bazı hücrelerde ise şişme ve hücre ve çekirdek sınırlarında silikleşme mevcuttu. Ayrıca hücre sayısında azalma gözlendi. SİR, TİR ve STİR gruplarında da ödem, doku bütünlüğünde bozulma, vakuoller dejenere nöronlar ve gliyalar mevcut olmakla birlikte REP grubundaki kadar şiddetli değildi. Tüm gruplarda beyaz cevher nispeten korunmuş olarak izlendi.

Serebellum kesitlerinde SHAM grubunda moleküler tabaka, granüler tabaka, purkinje hücreleri ve beyaz cevher incelendi. SHAM grubunda genel mimari yapı, Purkinje hücreleri, nöron ve gliyalar sağlıklı bir şekilde izlendi. Dokuda ödem ve ayrışma gözlenmedi. Hücre sınırları netti. REP grubunda özellikle moleküler tabakada belirgin ödem, vakuoller ve doku bütünlüğünde bozulma mevcuttu. Hücreler daha eozinofilik ve sınırları silikleşmiş olarak görüldü. Purkinje hücrelerinde de büzüşme veya şişme ve hücre sınırlarında silikleşme mevcuttu. Granüler tabakada da dokuda ayrışmalar, ödem ve eozinofilik hücreler gözlendi. Beyaz cevher nispeten korunmuştu. SİR, TİR ve STİR gruplarında da moleküler ve granüler tabakada ödem, doku bütünlüğünde bozulma eozinofilik hücreler, dejenere Purkinje hücreleri mevcut olmakla birlikte REP grubundaki kadar şiddetli değildi. Üç grupta da beyaz cevher nispeten korunmuş olarak izlendi.

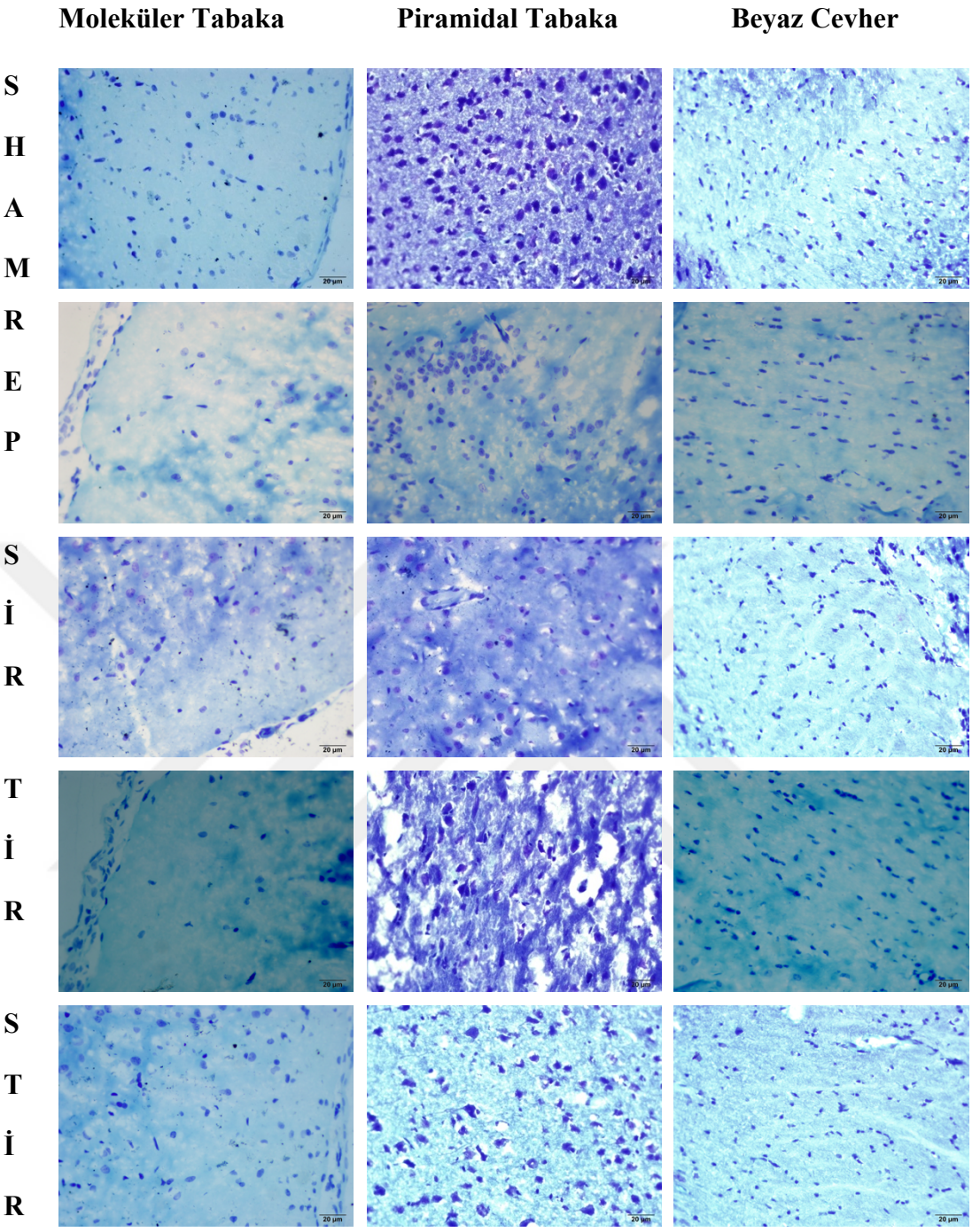


Şekil 3.1. Serebrum H&E görüntüleri frontal korteks moleküler tabaka, piramidal tabaka ve beyaz cevher görülmektedir.

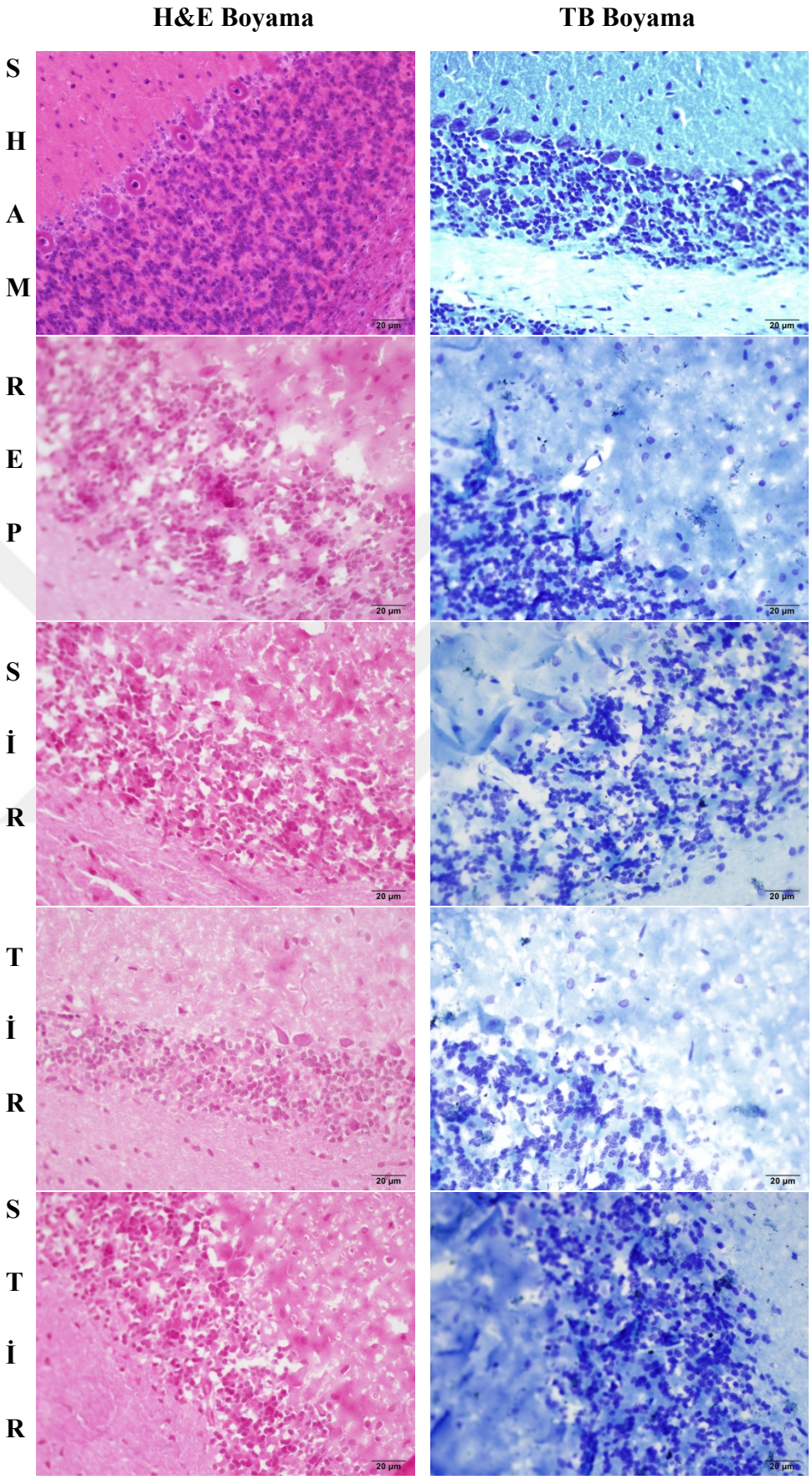
3.2.2. Toluidin Blue Boyama Sonuçları

TB boyanan serebrum frontal korteks ve serebellum kesitleri incelendi. Serebrum frontal korteks kesitlerinde gri cevher ve beyaz cevher incelendi; SHAM grubunda düzgün bir doku mimarisi, sağlıklı nöron ve gliyalar izlendi. REP grubunda özellikle gri cevherde özellikle moleküler tabakada doku bütünlüğünde bozulma ve şiddetli ödem ve artmış vakuoller mevcuttu. Piramidal tabakada en belirgin olacak şekilde bazı hücrelerde büzüşme, bazı hücrelerde ise şişme ve hücre ve çekirdek sınırlarında silikleşme mevcuttu. Ayrıca hücre sayısında azalma gözlendi. SİR, TİR ve STİR gruplarında da ödem, doku bütünlüğünde bozulma, vakuoller dejenere nöronlar ve gliyalar mevcut olmakla birlikte REP grubundaki kadar şiddetli değildi. Tüm gruplarda beyaz cevher nispeten korunmuş olarak izlendi.

Serebellum kesitlerinde SHAM grubunda moleküler tabaka, granüler tabaka, purkinje hücreleri ve beyaz cevher incelendi. SHAM grubunda genel mimari yapı, Purkinje hücreleri, nöron ve gliyaların sağlıklı olduğu görüldü. Dokuda ödem ve ayrışma yoktu ve hücre sınırları netti. REP grubunda özellikle moleküler tabakada vakuoller, belirgin ödem ve doku bütünlüğünde bozulma mevcuttu. Purkinje hücrelerinde de büzüşme veya şişme ve hücre sınırlarında silikleşme mevcuttu. Granüler tabakada dokuda ayrışmalar, ödem ve büzüşmüş hücreler gözlendi. Beyaz cevher nispeten korunmuştu. SİR, TİR ve STİR gruplarında da moleküler ve granüler tabakada ödem, doku bütünlüğünde bozulma dejenere hücreler mevcut olmakla birlikte REP grubundaki kadar şiddetli değildi. Üç grupta da beyaz cevher nispeten korunmuş olarak izlendi.



Şekil 3.2. Serebrum TB görüntüleri frontal korteks moleküler tabaka, piramidal tabaka ve beyaz cevher görülmektedir.



Şekil 3.3. Serebellum H&E ve TB görüntüleri moleküler tabaka, granüler tabaka Purkinje hücreleri ve beyaz cevherleri görülmektedir.

3.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

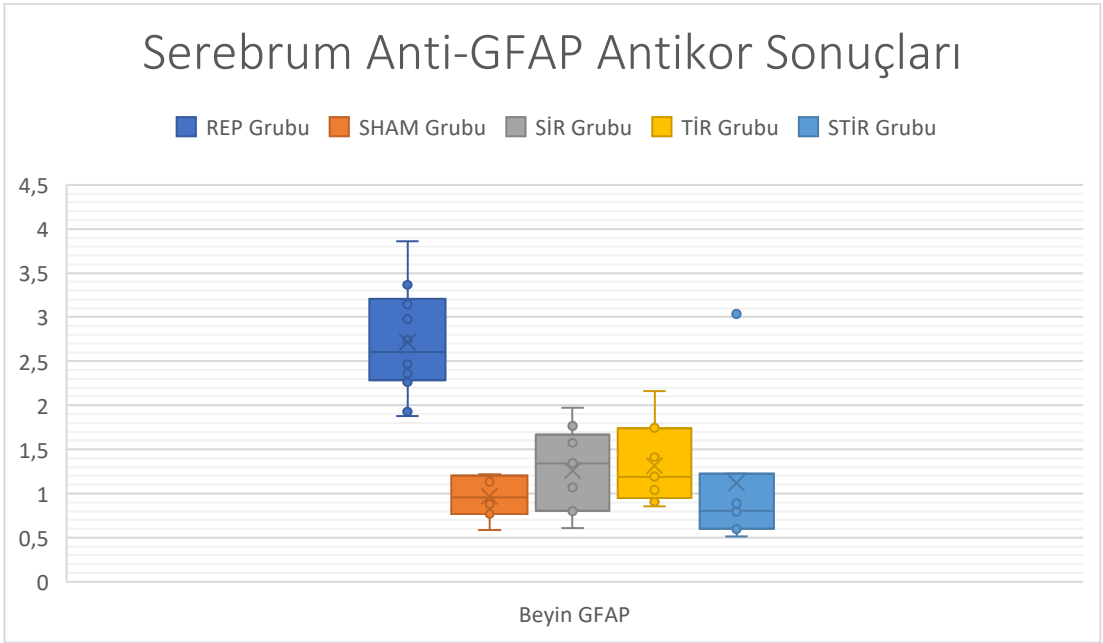
Anti-GFAP antikor sonuçları

Frontal korteks dokusunun Anti-GFAP antikor işaretlemeleri Şekil 3.1.'de, istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 3.5 ile Grafik 3.3'te ve gruplar arası farklar Tablo 3.6'da verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında REP grubu en yüksek, SHAM grubu ise en düşük ortalama değerlere sahiptir. İstatistik karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti (p=0,000). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 3.5. Serebrum frontal korteks anti-GFAP antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	2,6191	0,65832	0,19004	2,2009	3,0374
SHAM grubu	7	0,9645	0,23747	0,08976	0,7449	1,1842
SİR grubu	9	1,2596	0,47062	0,15687	0,8978	1,6213
TİR grubu	11	1,3183	0,43575	0,13138	1,0255	1,6110
STİR grubu	10	1,0133	0,73625	0,23282	0,4866	1,5399
TOTAL	49	1,5133	0,84082	0,12012	1,2718	1,7548

ANOVA sonucu: p=0.000

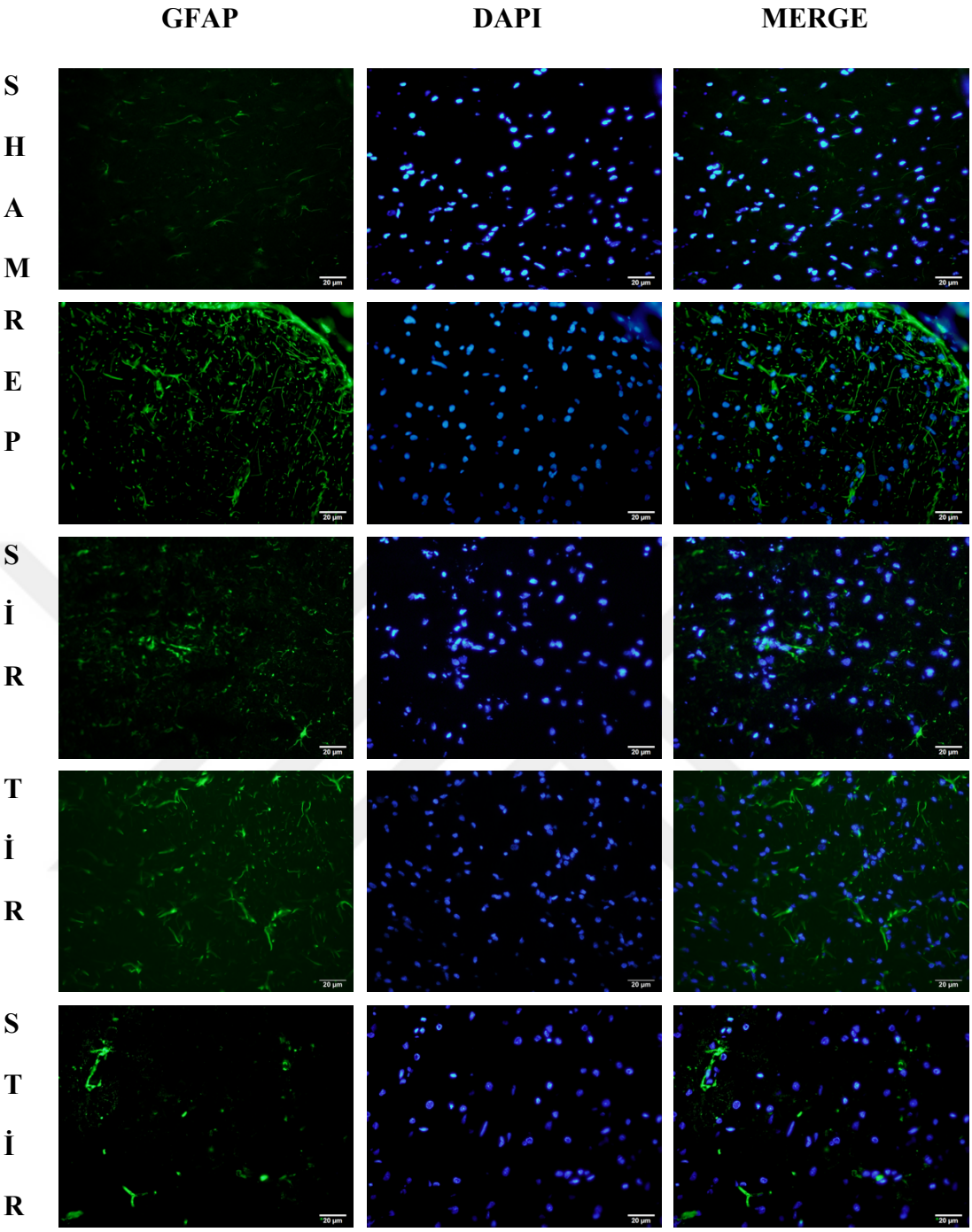


Grafik 3.3. Serebrum frontal korteks anti-GFAP antikor sonuçları.

Tablo 3.6. Serebrum anti-GFAP antikor Tukey's Hsd sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	1,65458*	0,26494	0,000
	SİR grubu	1,35957*	0,24565	0,000
	TİR grubu	1,30087*	0,23254	0,000
	STİR grubu	1,60586*	0,23853	0,000
SHAM grubu	**REP grubu**	-1,65458*	0,26494	0,000
	SİR grubu	-0,29501	0,28074	0,830
	TİR grubu	-0,35371	0,26934	0,685
	STİR grubu	-0,04872	0,27453	1,000
SİR grubu	**REP grubu**	-1,35957*	0,24565	0,000
	SHAM grubu	0,29501	0,28074	0,830
	TİR grubu	-0,05870	0,25039	0,999
	STİR grubu	0,24629	0,25596	0,870
TİR grubu	**REP grubu**	-1,30087*	0,23254	0,000
	SHAM grubu	0,35371	0,26934	0,685
	SİR grubu	0,05870	0,25039	0,999
	STİR grubu	0,30499	0,24340	0,721
STİR grubu	**REP grubu**	-1,60586*	0,23853	0,000
	SHAM grubu	0,04872	0,27453	1,000
	SİR grubu	-0,24629	0,25596	0,870
	TİR grubu	-0,30499	0,24340	0,721

(*p<0,05)



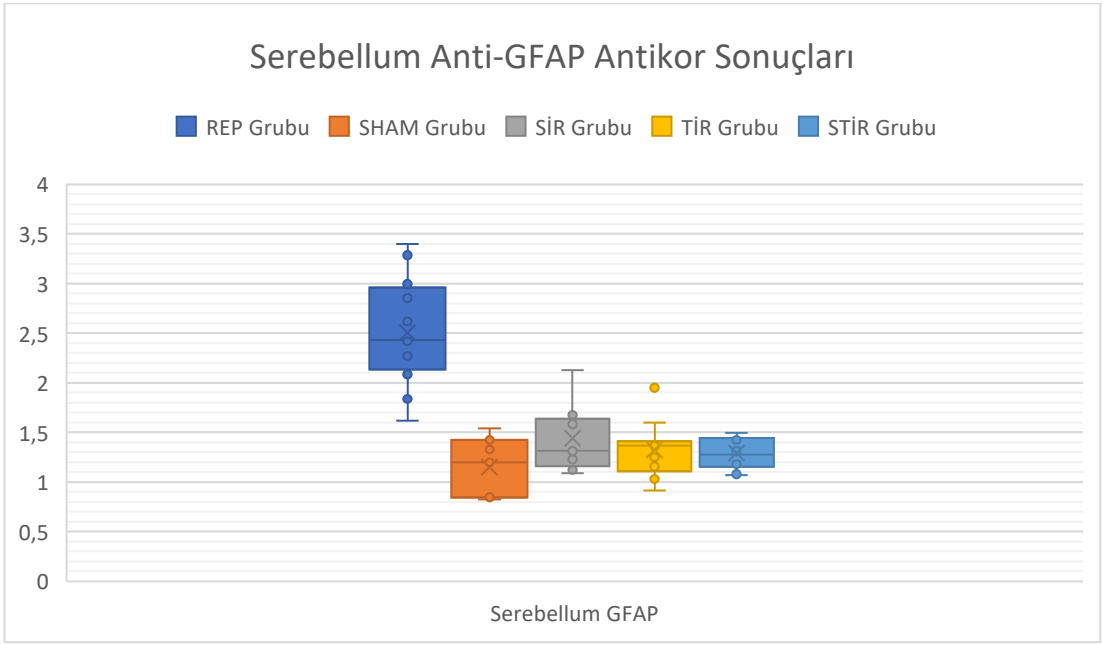
Şekil 3.4. Serebrum frontal korteks dokusu anti-GFAP antikoru ile işaretlenmeleri.

Serebellum dokusunun Anti-GFAP antikor boyamaları moleküler tabaka, granüler tabaka ve beyaz cevherde ayrı ayrı ve tüm alanlar toplu olarak değerlendirilmiştir. Serebellum genel Anti-GFAP antikor işaretlemeleri Şekil 3.2'de ve istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 3.7 ile Grafik 3.4'te ve gruplar arası farklar Tablo 3.8'de verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında REP grubu en yüksek, SHAM grubu ise en düşük ortalama değerlere sahiptir. İstatistik karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti (p=0,000). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 3.7. Serebellum anti-GFAP antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
REP grubu	12	2,5083	0,54837	0,15830	2,1599	2,8567
SHAM grubu	7	1,1472	0,29962	0,11324	0,8701	1,4243
SİR grubu	9	1,4374	0,33965	0,11322	1,1764	1,6985
TİR grubu	11	1,3235	0,28555	0,08610	1,1317	1,5154
STİR grubu	10	1,2927	0,15765	0,04985	1,1799	1,4054
TOTAL	49	1,6031	0,63190	0,09027	1,4216	1,7846

ANOVA sonucu: p=0.000

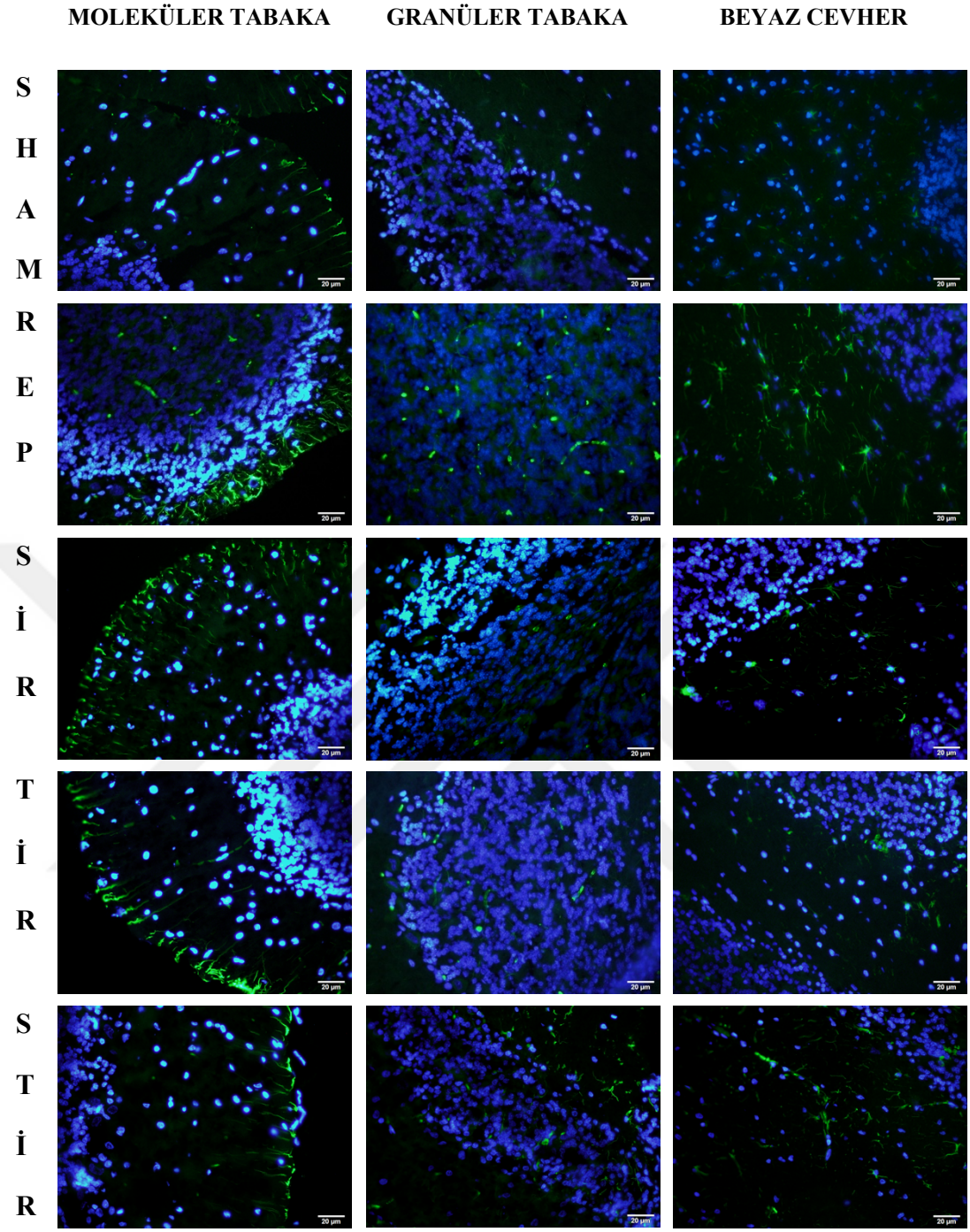


Grafik 3.4. Serebellum anti-GFAP antikor sonuçları.

Tablo 3.8. Serebellum anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	1,36113*	0,19464	0,000
	SİR grubu	1,07083*	0,19462	0,000
	TİR grubu	1,18475*	0,18020	0,000
	STİR grubu	1,21561*	0,16597	0,000
SHAM grubu	**REP grubu**	-1,36113*	0,19464	0,000
	SİR grubu	-0,29029	0,16013	0,618
	TİR grubu	-0,17638	0,14226	0,934
	STİR grubu	-0,14551	0,12373	0,958
SİR grubu	**REP grubu**	-1,07083*	0,19462	0,000
	SHAM grubu	0,29029	0,16013	0,618
	TİR grubu	0,11391	0,14224	0,997
	STİR grubu	0,14478	0,12371	0,955
TİR grubu	**REP grubu**	-1,18475*	0,18020	0,000
	SHAM grubu	0,17638	0,14226	0,934
	SİR grubu	-0,11391	0,14224	0,997
	STİR grubu	0,03086	0,09949	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	-1,21561*	0,16597	0,000
	SHAM grubu	0,14551	0,12373	0,958
	SİR grubu	-0,14478	0,12371	0,955
	TİR grubu	-0,03086	0,09949	1,000

(*p<0,05)



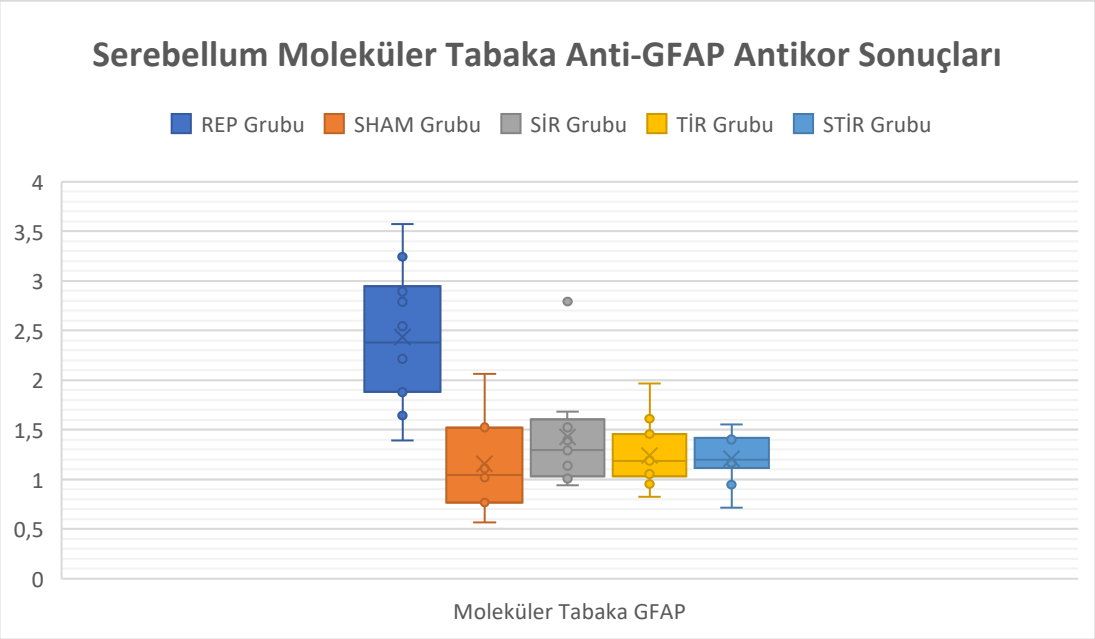
Şekil 3.5. Serebellum moleküler tabaka, granüler tabaka ve beyaz cevher anti-GFAP antikor işaretlenmeleri.

Serebellum moleküler tabaka değerlendirme sonuçları Şekil 3.3'de ve değerleri Tablo 3.9 ile Grafik 3.5'te ve gruplar arası farklar Tablo 3.10'da verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında REP grubu en yüksek ortalama değerlere sahipti ($p<0,005$). İstatistik karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti ($p<0,000$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 3.9. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için%95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	2,4373	0,67437	0,19467	2,0088	2,8657
SHAM grubu	7	1,1563	0,49892	0,18858	0,6949	1,6177
SİR grubu	9	1,4257	0,56996	0,18999	0,9876	1,8638
TİR grubu	11	1,2418	0,32631	0,09839	1,0226	1,4610
STİR grubu	10	1,2075	0,24671	0,07802	1,0310	1,3840
TOTAL	49	1,5491	0,70114	0,10016	1,3477	1,7505

ANOVA sonucu: p=0.000

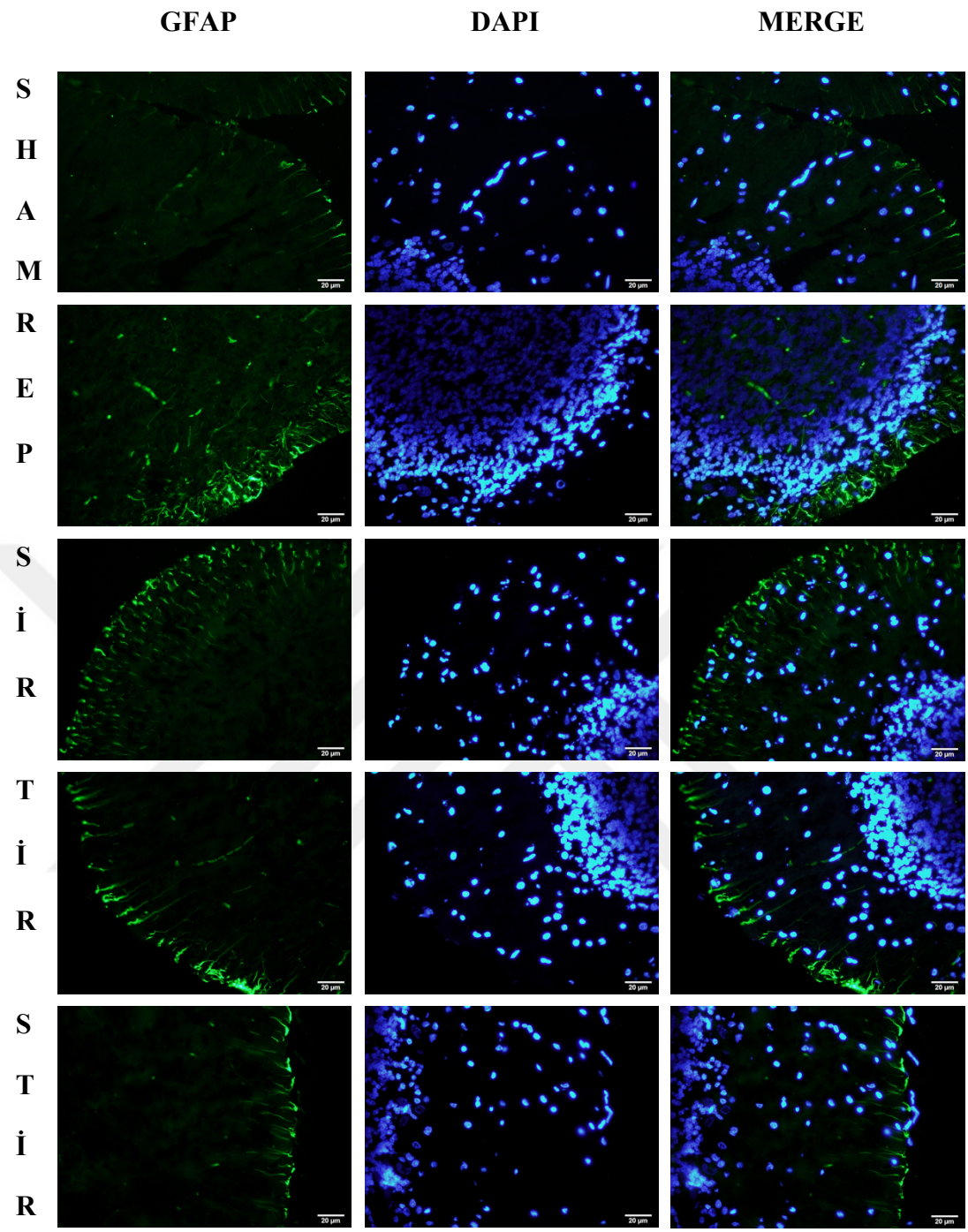


Grafik 3.5. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları.

Tablo 3.10. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	1,28095*	0,27103	0,002
	SİR grubu	1,01155*	0,27202	0,015
	TİR grubu	1,19548*	0,21812	0,000
	STİR grubu	1,22980*	0,20973	0,000
SHAM grubu	**REP grubu**	-1,28095*	0,27103	0,002
	SİR grubu	-0,26940	0,26768	0,982
	TİR grubu	-0,08547	0,21270	1,000
	STİR grubu	-0,05115	0,20408	1,000
SİR grubu	**REP grubu**	-1,01155*	0,27202	0,015
	SHAM grubu	0,26940	0,26768	0,982
	TİR grubu	0,18393	0,21395	0,995
	STİR grubu	0,21825	0,20538	0,976
TİR grubu	**REP grubu**	-1,19548*	0,21812	0,000
	SHAM grubu	0,08547	0,21270	1,000
	SİR grubu	-0,18393	0,21395	0,995
	STİR grubu	0,03432	0,12556	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	-1,22980*	0,20973	0,000
	SHAM grubu	0,05115	0,20408	1,000
	SİR grubu	-0,21825	0,20538	0,976
	TİR grubu	-0,03432	0,12556	1,000

(*p<0,05)



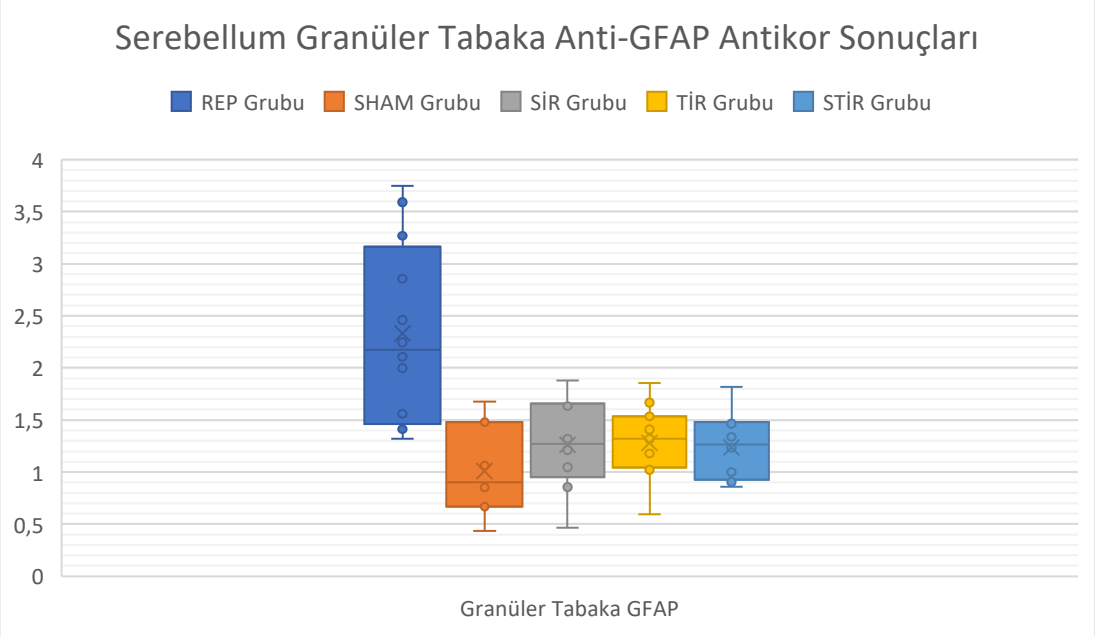
Şekil 3.6. Serebellum moleküler tabaka anti-GFAP antikor işaretlenmeleri.

Serebellum granüler tabaka değerlendirme sonuçları Şekil 3.4'te ve değerleri Tablo3.11 ile Grafik 3.5'te ve gruplar arası farklar Tablo 3.12'de verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında REP grubu en yüksek ortalama değerlere sahipti. İstatistik karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 3.11. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	2,3326	0,86363	0,24931	1,7839	2,8813
SHAM grubu	7	1,0105	0,43689	0,16513	0,6065	1,4146
SİR grubu	9	1,2620	0,43973	0,14658	0,9240	1,6000
TİR grubu	11	1,2781	0,34954	0,10539	1,0433	1,5129
STİR grubu	10	1,2358	0,31398	0,09929	1,0111	1,4604
TOTAL	49	1,4865	0,71796	0,10257	1,2803	1,6927

ANOVA sonucu: p=0.000

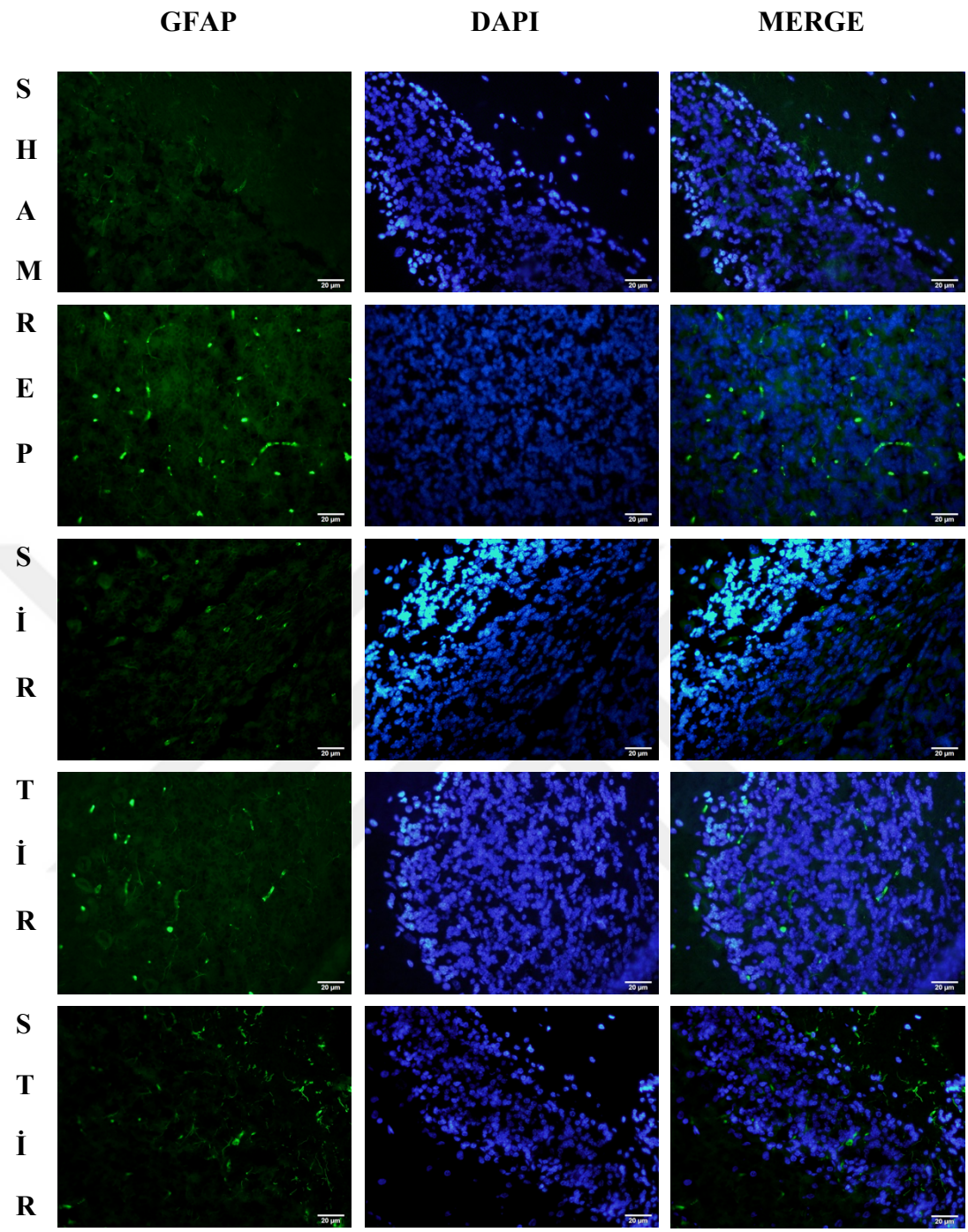


Grafik 3.6. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor sonuçları.

Tablo 3.12. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	1,32209*	0,29904	0,004
	SİR grubu	1,07063*	0,28921	0,017
	TİR grubu	1,05451*	0,27067	0,015
	STİR grubu	1,09685*	0,26835	0,011
SHAM grubu	**REP grubu**	-1,32209*	0,29904	0,004
	SİR grubu	-0,25146	0,22080	0,960
	TİR grubu	-0,26758	0,19589	0,892
	STİR grubu	-0,22524	0,19268	0,956
SİR grubu	**REP grubu**	-1,07063*	0,28921	0,017
	SHAM grubu	0,25146	0,22080	0,960
	TİR grubu	-0,01612	0,18053	1,000
	STİR grubu	0,02622	0,17704	1,000
TİR grubu	**REP grubu**	-1,05451*	0,27067	0,015
	SHAM grubu	0,26758	0,19589	0,892
	SİR grubu	0,01612	0,18053	1,000
	STİR grubu	0,04234	0,14479	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	-1,09685*	0,26835	0,011
	SHAM grubu	0,22524	0,19268	0,956
	SİR grubu	-0,02622	0,17704	1,000
	TİR grubu	-0,04234	0,14479	1,000

(*p<0,05)



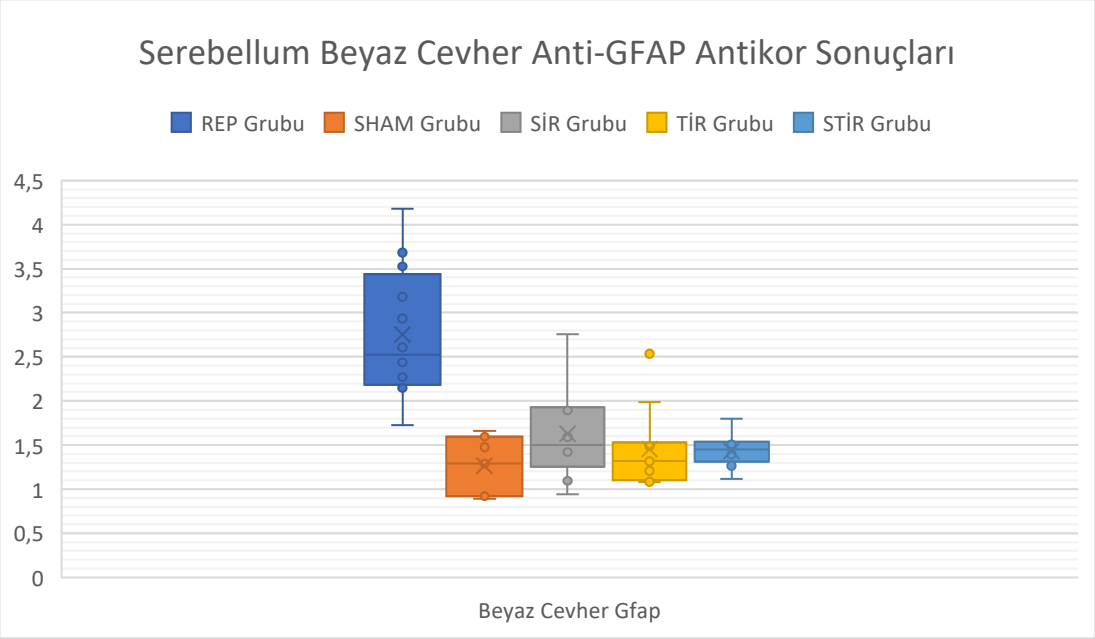
Şekil 3.7. Serebellum granüler tabaka anti-GFAP antikor işaretlenmeleri.

Serebellum beyaz cevher değerlendirme sonuçları Şekil 3.3'te ve değerleri Tablo3.9 ile Grafik 3.5'te ve gruplar arası farklar Tablo 3.10'da verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında REP grubu en yüksek ortalama değerlere sahipti. İstatistik karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 3.13. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	2,7550	0,74577	0,21528	2,2811	3,2288
SHAM grubu	7	1,2616	0,32568	0,12310	0,9604	1,5628
SİR grubu	9	1,6246	0,53637	0,17879	1,2123	2,0369
TİR grubu	11	1,4507	0,45289	0,13655	1,1464	1,7550
STİR grubu	10	1,4348	0,18789	0,05942	1,3004	1,5692
TOTAL	49	1,7718	0,75430	0,10776	1,5551	1,9885

ANOVA sonucu: p=0.000

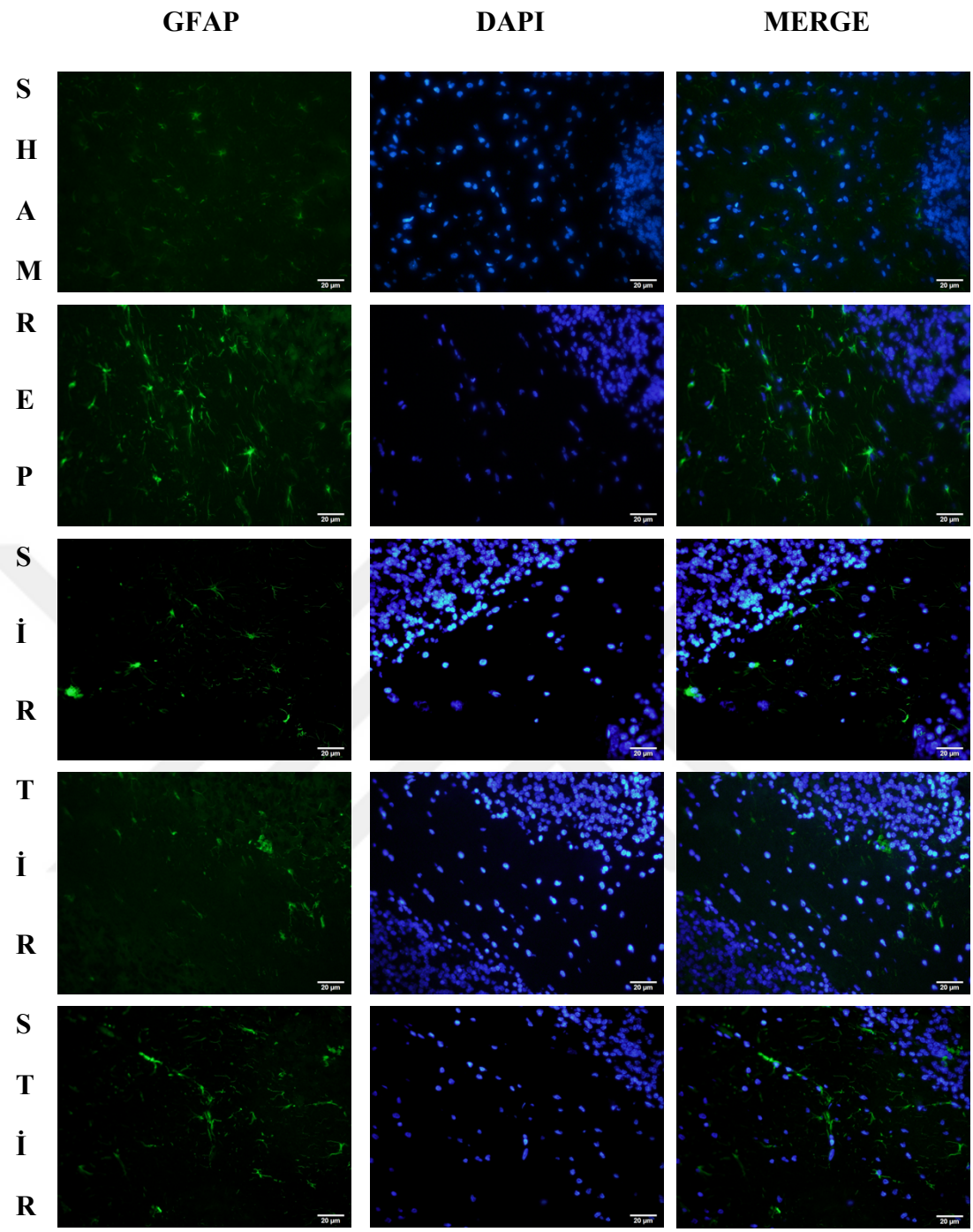


Grafik 3.7. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor sonuçları.

Tablo 3.14. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	1,49332*	0,24799	0,000
	SİR grubu	1,13032*	0,27984	0,007
	TİR grubu	1,30425*	0,25494	0,001
	STİR grubu	1,32018*	0,22333	0,001
SHAM grubu	**REP grubu**	-1,49332*	0,24799	0,000
	SİR grubu	-0,36300	0,21707	0,714
	TİR grubu	-0,18906	0,18385	0,979
	STİR grubu	-0,17313	0,13668	0,934
SİR grubu	**REP grubu**	-1,13032*	0,27984	0,007
	SHAM grubu	0,36300	0,21707	0,714
	TİR grubu	0,17393	0,22497	0,998
	STİR grubu	0,18986	0,18840	0,984
TİR grubu	**REP grubu**	-1,30425*	0,25494	0,001
	SHAM grubu	0,18906	0,18385	0,979
	SİR grubu	-0,17393	0,22497	0,998
	STİR grubu	0,01593	0,14892	1,000
STİR grubu	**REP grubu**	-1,32018*	0,22333	0,001
	SHAM grubu	0,17313	0,13668	0,934
	SİR grubu	-0,18986	0,18840	0,984
	TİR grubu	-0,01593	0,14892	1,000

(*p<0,05)



Şekil 3.8. Serebellum beyaz cevher anti-GFAP antikor işaretlenmeleri.

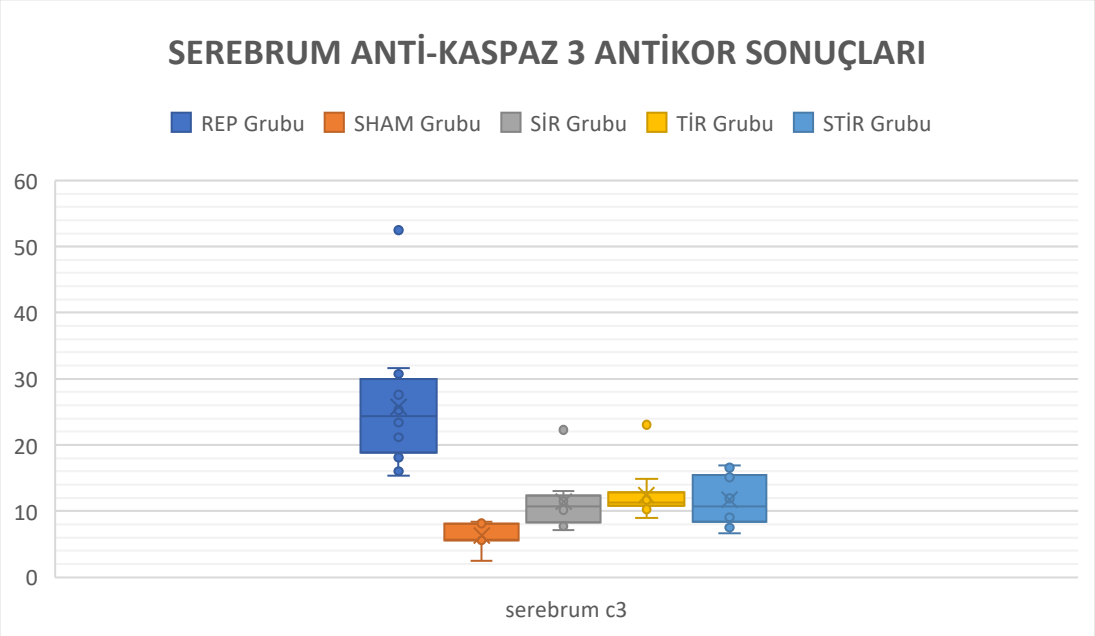
Anti-Kaspaz 3 antikor sonuçları

Grupların frontal korteks kesitlerinde kaspaz-3 boyamaları Şekil 3.9'da değerleri Tablo 3.15 ve Grafik 3.8'de gruplar arası farklılıklar Tablo 3.16'da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde REP grubu en yüksek, SHAM grubu en düşük skor değerlerine sahipti. Tüm gruplar REP grubuna göre anlamlı derecede düşük değerlere sahipti (p=0.000).

Tablo 3.15. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	25,7975	9,89697	2,85701	19,5093	32,0857
SHAM grubu	7	6,2916	2,12375	0,80270	4,3274	8,2557
SİR grubu	9	11,4528	4,48975	1,49658	8,0017	14,9040
TİR grubu	11	12,4557	3,83042	1,15491	9,8824	15,0290
STİR grubu	10	11,7097	3,92745	1,24197	8,9001	14,5192
TOTAL	49	14,5060	8,85292	1,26470	11,9632	17,0489

ANOVA sonucu: p=0.000

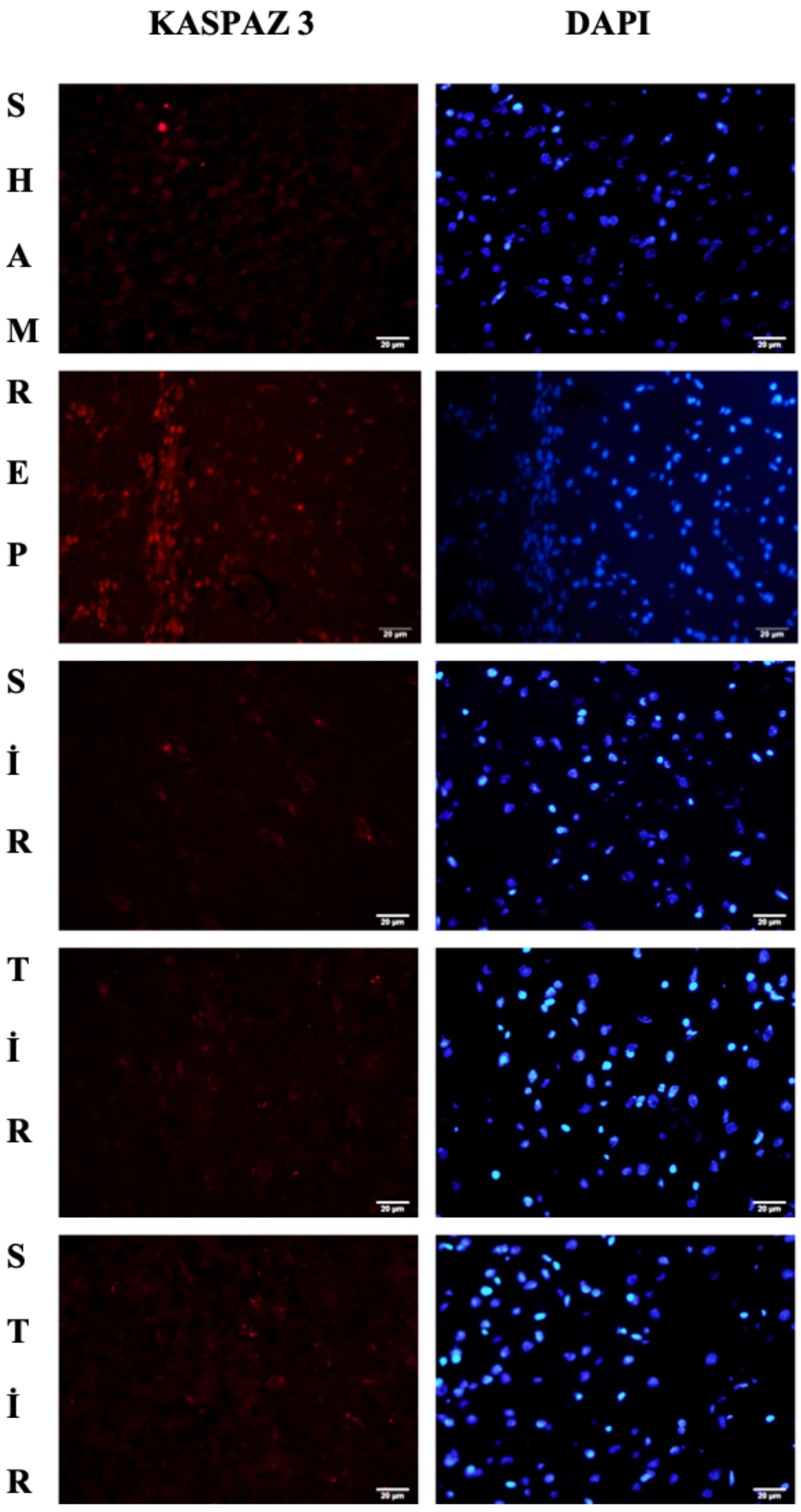


Grafik 3.8. Serebrum frontal korteks anti-Kaspaz 3 antikor sonuçları.

Tablo 3.16. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor Tukey's Hsd sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	19,50591*	2,82398	0,000
	SİR grubu	14,34466*	2,61832	0,000
	TİR grubu	13,34176*	2,47857	0,000
	STİR grubu	14,08784*	2,54241	0,000
SHAM grubu	**REP grubu**	-19,50591*	2,82398	0,000
	SİR grubu	-5,16125	2,99236	0,430
	TİR grubu	-6,16415	2,87088	0,219
	STİR grubu	-5,41807	2,92617	0,358
SİR grubu	**REP grubu**	-14,34466*	2,61832	0,000
	SHAM grubu	5,16125	2,99236	0,430
	TİR grubu	-1,00290	2,66883	0,996
	STİR grubu	-0,25682	2,72822	1,000
TİR grubu	**REP grubu**	-13,34176*	2,47857	0,000
	SHAM grubu	6,16415	2,87088	0,219
	SİR grubu	1,00290	2,66883	0,996
	STİR grubu	0,74608	2,59440	0,998
STİR grubu	**REP grubu**	-14,08784*	2,54241	0,000
	SHAM grubu	5,41807	2,92617	0,358
	SİR grubu	0,25682	2,72822	1,000
	TİR grubu	-0,74608	2,59440	0,998

(*p<0,05)



Şekil 3.9. Serebrum frontal korteks anti-kaspaz 3 antikor işaretlenmeleri.

3.2.4. TUNEL Sonuçları

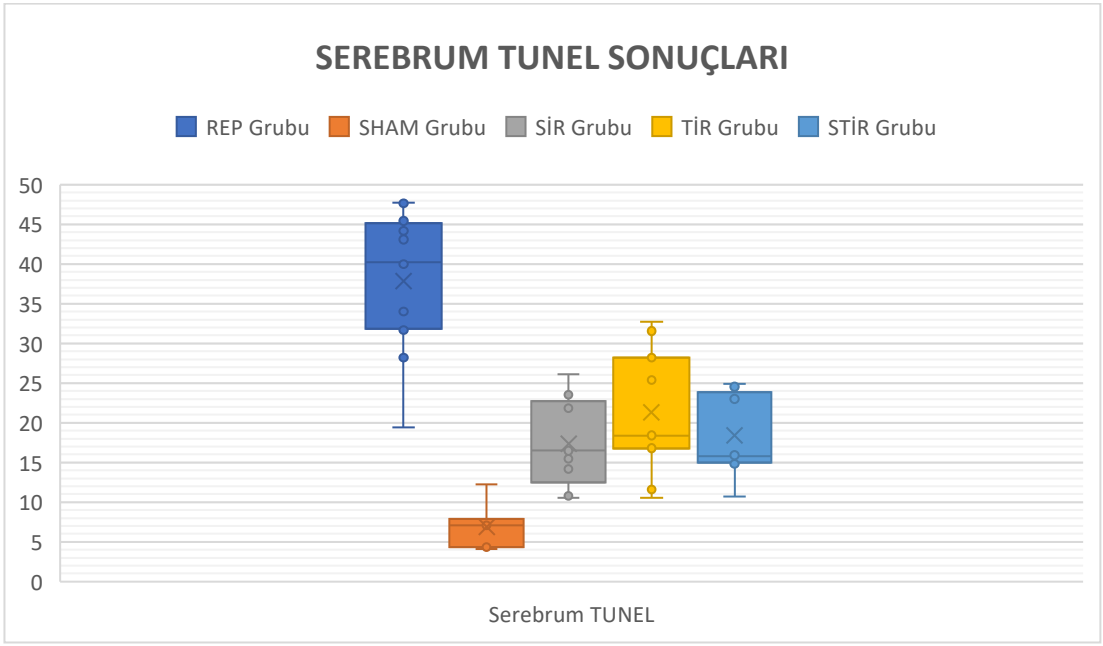
Serebrum TUNEL sonuçları

Grupların frontal korteks kesitlerinde TUNEL işaretlemeleri Şekil 3.7'de değerleri Tablo 3.17 ve Grafik 3.9'da gruplar arası farklılıklar Tablo 3.18'de verilmiştir. REP grubu en yüksek, SHAM grubu en düşük değerlere sahipti ($p<0,005$). SİR, TİR ve STİR grubu REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti ($p<0,005$). Ancak SİR, TİR ve STİR grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 3.17. Serebrum frontal korteks TUNEL sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	37,8626	8,76870	2,53131	32,2912	43,4340
SHAM grubu	7	6,8957	2,82799	1,06888	4,2802	9,5111
SİR grubu	9	17,3700	5,46322	1,82107	13,1706	21,5694
TİR grubu	11	21,3410	7,70257	2,32241	16,1663	26,5156
STİR grubu	10	18,3948	5,10455	1,61420	14,7432	22,0464
TOTAL	49	21,9928	11,99347	1,71335	18,5479	25,4378

ANOVA sonucu: p=0.000

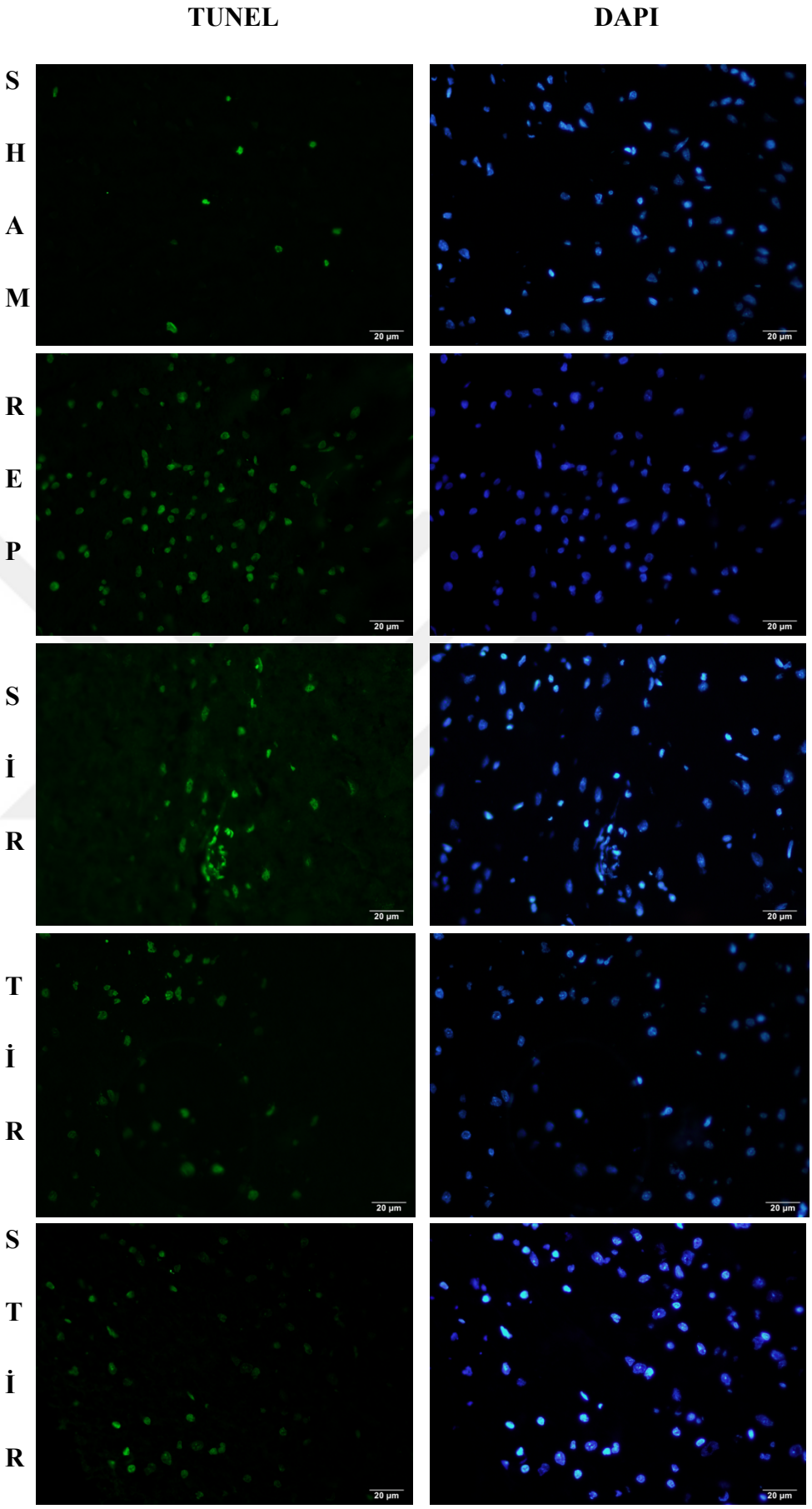


Grafik 3.9. Serebrum frontal korteks TUNEL sonuçları.

Tablo 3.18. Serebrum frontal korteks TUNEL Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	SHAM grubu	30,96692*	2,74773	0,000
	SİR grubu	20,49260*	3,11830	0,000
	TİR grubu	16,52164*	3,43527	0,001
	STİR grubu	19,46779*	3,00219	0,000
SHAM grubu	REP grubu	-30,96692*	2,74773	0,000
	SİR grubu	-10,47432*	2,11159	0,003
	TİR grubu	-14,44528*	2,55658	0,001
	STİR grubu	-11,49913*	1,93601	0,000
SİR grubu	REP grubu	-20,49260*	3,11830	0,000
	SHAM grubu	10,47432*	2,11159	0,003
	TİR grubu	-3,97096	2,95125	0,886
	STİR grubu	-1,02481	2,43350	1,000
TİR grubu	REP grubu	-16,52164*	3,43527	0,001
	SHAM grubu	14,44528*	2,55658	0,001
	SİR grubu	3,97096	2,95125	0,886
	STİR grubu	2,94615	2,82829	0,976
STİR grubu	REP grubu	-19,46779*	3,00219	0,000
	SHAM grubu	11,49913*	1,93601	0,000
	SİR grubu	1,02481	2,43350	1,000
	TİR grubu	-2,94615	2,82829	0,976

(*p<0,05)



Şekil 3.10. Serebrum frontal korteks TUNEL işaretlenmeleri.

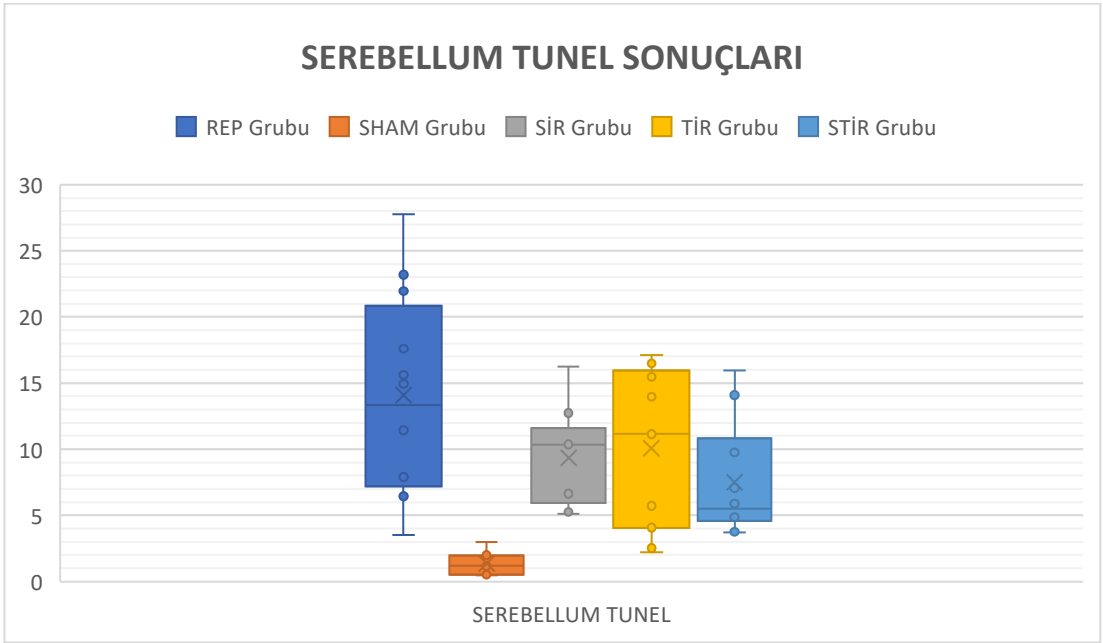
Serebellum TUNEL sonuçları

Grupların serebellum kesitlerinde TUNEL işaretlemeleri Şekil 3.8'de değerleri Tablo 3.19 ve grafik 3.10'da gruplar arası farklılıklar tablo 3.20'de verilmiştir. SHAM grubunun değerleri diğer tüm gruplardan anlamı derecede düşüktür ($p<0,05$). Ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Tablo 3.19. Serebellum TUNEL sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	14,0880	7,49680	2,16414	9,3248	18,8513
SHAM grubu	7	1,3530	0,90950	0,34376	0,5118	2,1941
SİR grubu	9	9,3367	3,72191	1,24064	6,4758	12,1977
TİR grubu	11	10,0712	6,00269	1,80988	6,0386	14,1039
STİR grubu	10	7,5372	4,33171	1,36981	4,4385	10,6359
TOTAL	49	9,1574	6,48239	0,92606	7,2955	11,0194

ANOVA sonucu: p=0.000

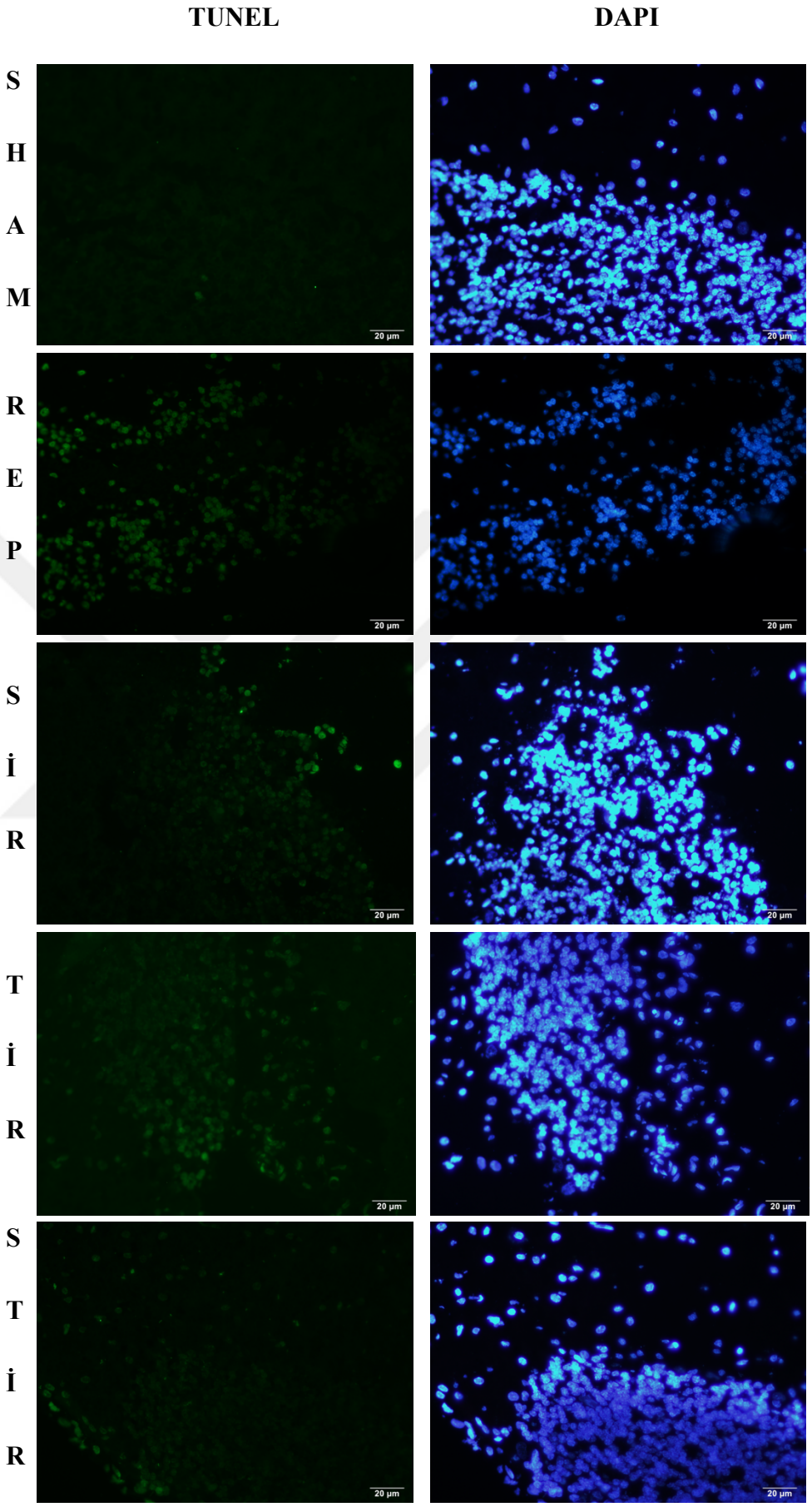


Grafik 3.10. Serebellum TUNEL sonuçları.

Tablo 3.20. Serebellum TUNEL Tamhane's-T2 sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	12,73510*	2,19127	0,001
	SİR grubu	4,75131	2,49453	0,536
	TİR grubu	4,01682	2,82120	0,844
	STİR grubu	6,55083	2,56122	0,181
SHAM grubu	**REP grubu**	-12,73510*	2,19127	0,001
	SİR grubu	-7,98378*	1,28738	0,001
	TİR grubu	-8,71827*	1,84224	0,007
	STİR grubu	-6,18427*	1,41228	0,013
SİR grubu	**REP grubu**	-4,75131	2,49453	0,536
	SHAM grubu	7,98378*	1,28738	0,001
	TİR grubu	-0,73449	2,19428	1,000
	STİR grubu	1,79952	1,84812	0,985
TİR grubu	**REP grubu**	-4,01682	2,82120	0,844
	SHAM grubu	8,71827*	1,84224	0,007
	SİR grubu	0,73449	2,19428	1,000
	STİR grubu	2,53400	2,26981	0,962
STİR grubu	**REP grubu**	-6,55083	2,56122	0,181
	SHAM grubu	6,18427*	1,41228	0,013
	SİR grubu	-1,79952	1,84812	0,985
	TİR grubu	-2,53400	2,26981	0,962

(*p<0,05 olanlar işaretlendi.)



Şekil 3.11. Serebellum TUNEL işaretlenmeleri.

3.3. Biyokimyasal Bulgular

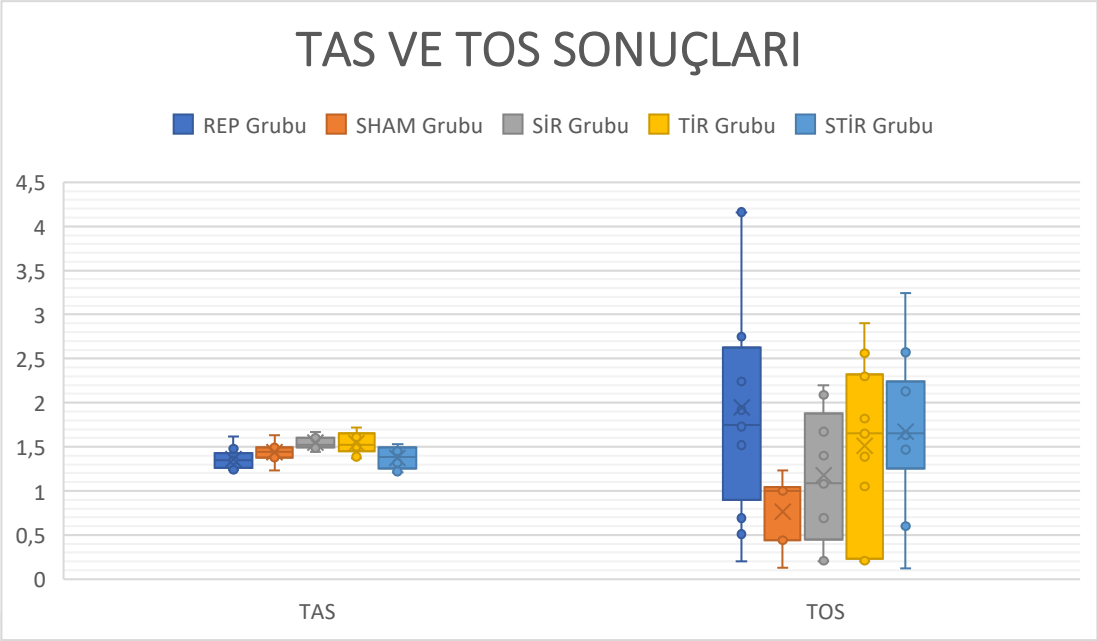
3.3.1. TAS, TOS ve OSI Sonuçları

TAS ve TOS miktarları ve OSI'nin değerleri Tablo 3.19, Grafik 3.11 ve Grafik 3.12'de, gruplar arası farklılıklar tablo 3.20'de verilmiştir. Yalnızca TAS değerlerinde SİR ve TİR grubunda REP grubuna oranla anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). TOS ve OSI değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

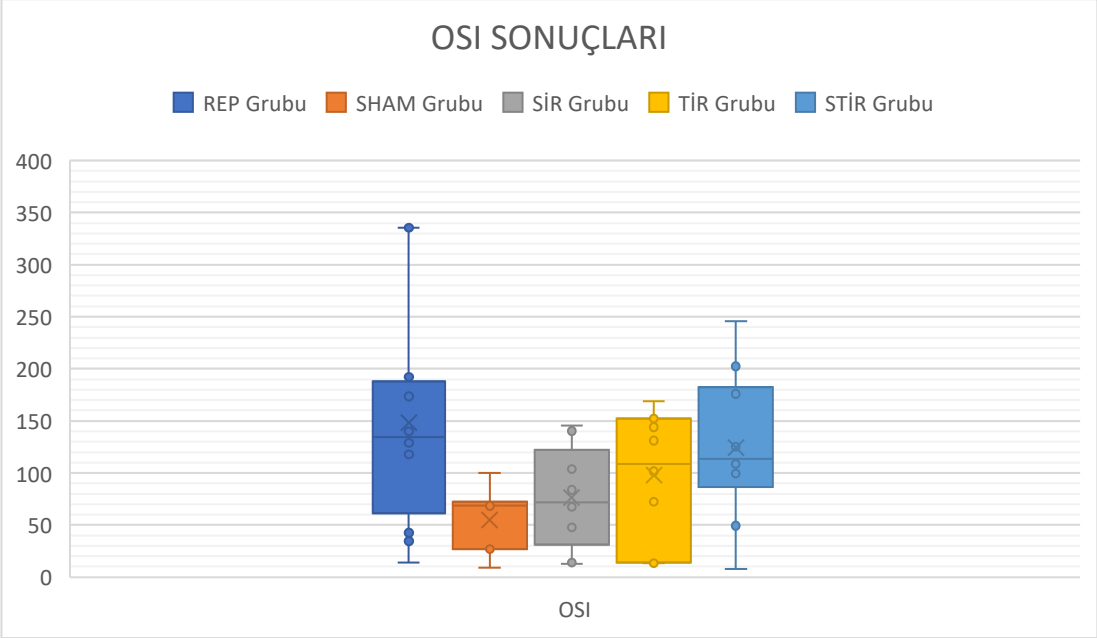
Tablo 3.21. Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları.

		N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı	
						Alt Sınır	Üst Sınır
TAS	REP grubu	12	1,3733	,12302	,03551	1,2952	1,4515
	SHAM grubu	7	1,4186	,11481	,04339	1,3124	1,5248
	SİR grubu	9	1,5444	,07282	,02427	1,4885	1,6004
	TİR grubu	11	1,5436	,11448	,03452	1,4667	1,6205
	STİR grubu	10	1,3770	,12490	,03950	1,2876	1,4664
	TOTAL	49	1,4502	,13439	,01920	1,4116	1,4888
TOS	REP grubu	12	1,6125	1,33175	,38444	,7663	2,4587
	SHAM grubu	7	1,3386	,90178	,34084	,5046	2,1726
	SİR grubu	9	1,1811	,73455	,24485	,6165	1,7457
	TİR grubu	11	1,5118	,98493	,29697	,8501	2,1735
	STİR grubu	10	1,6730	,88676	,28042	1,0387	2,3073
	TOTAL	49	1,4839	,98974	,14139	1,1996	1,7682
OSI	REP grubu	12	1,2391	1,09590	,31636	,5428	1,9354
	SHAM grubu	7	,9681	,66458	,25119	,3535	1,5828
	SİR grubu	9	,7639	,48128	,16043	,3939	1,1338
	TİR grubu	11	,9762	,60531	,18251	,5696	1,3829
	STİR grubu	10	1,2415	,69726	,22049	,7427	1,7403
	TOTAL	49	1,0546	,75542	,10792	,8376	1,2716

ANOVA SONUCU: N Yalnızca TAS için anlamlı sonuç elde edildi.
TAS: P=0.01
TOS: P=0.827
OSİ: P=0.596



Grafik 3.11. Serum TAS ve TOS sonuçları.



Grafik 3.12. Serum OSI sonuçları.

Tablo 3.22. Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları.

Bağımlı Değişken	(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
TAS	**REP grubu**	**SHAM grubu**	-0,04524	0,05363	0,915
		SİR grubu	-0,17111*	0,04972	0,011
		TİR grubu	-0,17030*	0,04707	0,006
		STİR grubu	-0,00367	0,04828	1,000
	SHAM grubu	**REP grubu**	0,04524	0,05363	0,915
		SİR grubu	-0,12587	0,05683	0,193
		TİR grubu	-0,12506	0,05452	0,166
		STİR grubu	0,04157	0,05557	0,944
	SİR grubu	**REP grubu**	0,17111*	0,04972	0,011
		SHAM grubu	0,12587	0,05683	0,193
		TİR grubu	0,00081	0,05068	1,000
		STİR grubu	0,16744*	0,05181	0,019
	TİR grubu	**REP grubu**	0,17030*	0,04707	0,006
		SHAM grubu	0,12506	0,05452	0,166
		SİR grubu	-0,00081	0,05068	1,000
		STİR grubu	0,16664*	0,04927	0,013
	STİR grubu	**REP grubu**	0,00367	0,04828	1,000
		SHAM grubu	-0,04157	0,05557	0,944
		SİR grubu	-0,16744*	0,05181	0,019
		TİR grubu	-0,16664*	0,04927	0,013
TOS	**REP grubu**	**SHAM grubu**	0,27393	0,48354	0,979
		SİR grubu	0,43139	0,44833	0,870
		TİR grubu	0,10068	0,42440	0,999
		STİR grubu	-0,06050	0,43533	1,000
	SHAM grubu	**REP grubu**	-0,27393	0,48354	0,979
		SİR grubu	0,15746	0,51237	0,998
		TİR grubu	-0,17325	0,49157	0,997
		STİR grubu	-0,33443	0,50104	0,962
	SİR grubu	**REP grubu**	-0,43139	0,44833	0,870
		SHAM grubu	-0,15746	0,51237	0,998
		TİR grubu	-0,33071	0,45698	0,950
		STİR grubu	-0,49189	0,46715	0,829
	TİR grubu	**REP grubu**	-0,10068	0,42440	0,999
		Sham grubu	0,17325	0,49157	0,997
		SİR grubu	0,33071	0,45698	0,950
		STİR grubu	-0,16118	0,44423	0,996
	STİR grubu	**REP grubu**	0,06050	0,43533	1,000
		SHAM grubu	0,33443	0,50104	0,962
		SİR grubu	0,49189	0,46715	0,829
		TİR grubu	0,16118	0,44423	0,996

Tablo 3.23. (Devam) Serum TAS, TOS ve OSI Sonuçları

OSI	**REP grubu**	**SHAM grubu**	0,27092	0,36386	0,945
		SİR grubu	0,47518	0,33736	0,626
		TİR grubu	0,26283	0,31935	0,922
		STİR grubu	-0,00245	0,32758	1,000
	SHAM grubu	**REP grubu**	-0,27092	0,36386	0,945
		SİR grubu	0,20427	0,38555	0,984
		TİR grubu	-0,00809	0,36990	1,000
		STİR grubu	-0,27337	0,37702	0,950
	SİR grubu	**REP grubu**	-0,47518	0,33736	0,626
		SHAM grubu	-0,20427	0,38555	0,984
		TİR grubu	-0,21236	0,34387	0,972
		STİR grubu	-0,47763	0,35152	0,657
	TİR grubu	**REP grubu**	-0,26283	0,31935	0,922
		SHAM grubu	0,00809	0,36990	1,000
		SİR grubu	0,21236	0,34387	0,972
		STİR grubu	-0,26528	0,33428	0,931
	STİR grubu	**REP grubu**	0,00245	0,32758	1,000
		SHAM grubu	0,27337	0,37702	0,950
		SİR grubu	0,47763	0,35152	0,657
		TİR grubu	0,26528	0,33428	0,931

(*p<0,05 anlamlı kabul edildi.)

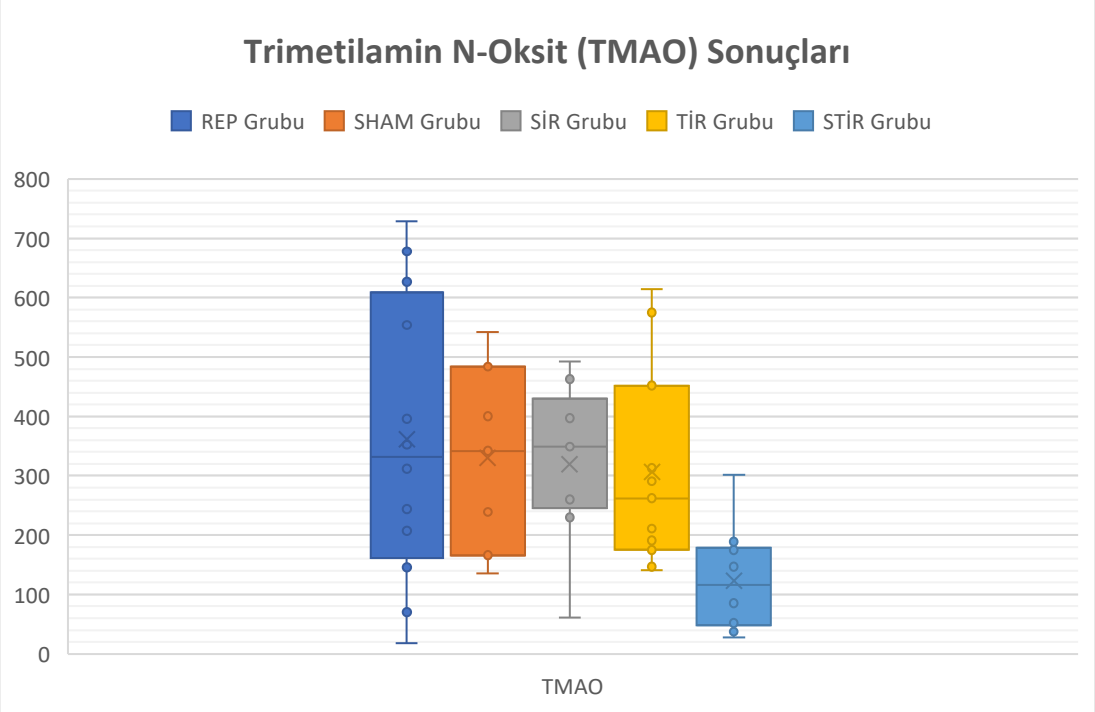
3.3.2. Trimetilamin N-Oksit (TMAO) Sonuçları

Serum TMAO değerleri Tablo 3.21 ve Grafik 3.13'te, gruplar arası farklılıklar tablo 3.20'de verilmiştir. Herhangi bir tedavi verilmeyen REP ve SHAM grubunda TMAO değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur. SİR, TİR ve STİR grubunda TMAO değerleri azalmış olmakla birlikte sadece STİR grubunda değerler REP ve SHAM grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

Tablo 3.24. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) sonuçları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
REP grubu	12	338,8000	225,21156	65,01298	195,7074	481,8926
SHAM grubu	7	368,1429	192,49106	72,75478	190,1183	546,1674
SİR grubu	9	319,5111	131,80403	43,93468	218,1976	420,8247
TİR grubu	11	306,5455	168,12636	50,69200	193,5966	419,4943
STİR grubu	10	122,9500	86,47412	27,34552	61,0901	184,8099
TOTAL	49	288,1571	184,29167	26,32738	235,2224	341,0919

ANOVA sonucu: p=0.024



Grafik 3.13. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) sonuçları.

Tablo 3.25. Serum Trimetilamin N-Oksit (TMAO) Tukey's Hsd sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Sig.
REP grubu	**SHAM grubu**	-29,34286	80,77424	0,996
	SİR grubu	19,28889	74,89167	0,999
	TİR grubu	32,25455	70,89452	0,991
	STİR grubu	215,85000*	72,72043	0,037
SHAM grubu	**REP grubu**	29,34286	80,77424	0,996
	SİR grubu	48,63175	85,59048	0,979
	TİR grubu	61,59740	82,11578	0,943
	STİR grubu	245,19286*	83,69725	0,041
SİR grubu	**REP grubu**	-19,28889	74,89167	0,999
	SHAM grubu	-48,63175	85,59048	0,979
	TİR grubu	12,96566	76,33666	1,000
	STİR grubu	196,56111	78,03533	0,105
TİR grubu	**REP grubu**	-32,25455	70,89452	0,991
	SHAM grubu	-61,59740	82,11578	0,943
	SİR grubu	-12,96566	76,33666	1,000
	STİR grubu	183,59545	74,20771	0,115
STİR grubu	**REP grubu**	-215,85000*	72,72043	0,037
	SHAM grubu	-245,19286*	83,69725	0,041
	SİR grubu	-196,56111	78,03533	0,105
	TİR grubu	-183,59545	74,20771	0,115

(*p<0,05 anlamlı kabul edildi.)

4. TARTIŞMA

Literatürde serebral iskemi reperfüzyon oluşturmak için kullanılan çok sayıda model ve yöntem mevcuttur. Araştırmalarda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan intraluminal stür modeli (*A. carotis communis'*e sokulan propilen ipliğin *A. cerebri media* girişinin tıkanması-MCAO) iskeminin en iyi taklit edildiği modeldir ve fokal bir serebral iskemi meydana getirir. Ancak ayrıntılı bir laboratuvar donanımı ve cerrahi deneyim gerektirmektedir (Longa ve ark 1989, Lopez ve Vemuganti 2018).

Global iskemik model, insanlarda kardiyak arrest veya koroner tıkanıklık durumunu taklit etmek için vertebral arterlerin, karotid arterlerin veya her ikisinin 5-15 dakika süreyle bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Eklöf ve Siesjö 1972, Tajiri ve ark 2013). Her iki *A. carotis communis*'in (BCCAO) yaklaşık 15 dk klemplenmesi ile hipokampus CA1 bölgesi, striatum ve neokorteks 3-4-5-6. tabakalarda nöron hasarına yol açmaktadır. Tıkanma geçici olarak sağlandığı için reperfüzyon çalışmalarında kullanılabilmektedir (Kuroiwa ve ark 1990, Dasdelen ve ark 2021, Gunduz ve ark 2021).

Serebral İ/R'de silimarin etkileri üzerine yapılan çalışmalarda hem MCAO modeli (Hou ve ark 2010, Raza ve ark 2011, Muley ve ark 2012, Wang ve ark 2016, Gupta ve Gupta 2017, Rathore ve ark 2020) hem de BCCAO modeli (Rui ve ark 1990, Muley ve ark 2013, Hirayama ve ark 2016, Moghaddam ve ark 2020, Mokhtari Sangdehi ve ark 2021) sıkça tercih edilmiştir.

Serebral İ/R'de timokinon etkileri üzerine yapılan çalışmalarda MCAO ve BCCAO'nun yanında 4 damar oklüzyonunun da kullanıldığı çalışmalar olmuştur (Al-Majed ve ark 2006, Hosseinzadeh ve ark 2007, Silachev ve ark 2015, Fan ve ark 2020, Tian ve ark 2020).

Çalışmamızda İ/R oluşturmak için ayrıntılı bir laboratuvar donanımı ve cerrahi deneyim gerektiren MCAO modeli yerine daha az ekipmanla uygulanabilen, cerrahi erişimi daha kolay olan ve reperfüzyon sonrası çalışmalara da olanak veren bilateral *a. carotis communis*'lerin oklüzyonu (BCCAO) yöntemi tercih edildi

Günümüzde, daha düşük edinme ve bakım maliyetleri, daha basit doku işleme ve izleme yöntemlerinin yanı sıra etik konular da göz önüne alınarak, in vivo İ/R

modelleri için çoğunlukla fare ve sıçanlar tercih edilmektedir. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu genç, sağlıklı, erkek inbred kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Sommer 2017).

Serebral İ/R'de silimarin etkileri üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğunda yetişkin Wistar-albino sıçanlar tercih edilmiştir (Raza ve ark 2011, Muley ve ark 2012, Muley ve ark 2013, Gupta ve Gupta 2017, Moghaddam ve ark 2020, Rathore ve ark 2020, Mokhtari Sangdehi ve ark 2021). Bunun dışında Sprague Dawley veya Long Evans sıçanlar, C57BL6/J fareler ve gerbiller ile yapılmış çalışmalar da mevcuttu (Rui ve ark 1990, Hou ve ark 2010, Hirayama ve ark 2016, Wang ve ark 2016). Çalışmaların bürük çoğunluğu yalnızca yetişkin erkek denekler kullanmışken hem erkek hem de dişi denekleri kullanan çalışmalar da vardır (Muley ve ark 2013). Yapılan bu çalışmalarda hayvan ağırlıkları 150 g ile 350 g arasında değişmektedir.

Serebral İ/R'de timokinon etkileri üzerine yapılan çalışmalarda ise Wistar-albino sıçanların yanında Sprague Dawley ve NMRI sıçanlar da kullanılmış, tamamında yetişkin erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalarda denek ağırlıkları 200-300 gr arasında değişmektedir (Al-Majed ve ark 2006, Hosseinzadeh ve ark 2007, Silachev ve ark 2015, Fan ve ark 2020, Tian ve ark 2020).

Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak yetişkin erkek Wistar-albino sıçanlar tercih edildi. Ağırlık tercihlerindeki çeşitlilikten dolayı cerrahi kolaylık sağlaması açısından nispeten daha büyük hayvanlar (300–400 gr) tercih edildi.

Çalışmamızda sıçanlarda her ikisi de antioksidan etkileriyle bilinen timokinon ve silimarinin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının; çift taraflı A. carotis communis'lerin ligasyonuyla İ/R hasarı oluşturulan sıçan modelinde nörolojik muayene skorları, frontal korteks ve serebellum dokusundaki apopitoz belirteçleri (TUNEL ve anti kaspaz 3), astrosit reaktivitesi (GFAP düzeyleri), kandaki oksidan-antioksidan sistem (TAS, TOS ve OSİ) ve TMAO düzeyleri üzerindeki etkisi incelendi.

Sonuçlar incelendiğinde beyinde TUNEL, anti kaspaz-3, anti-GFAP ekspresyonları birbiriyle uyumluydu. Her üç parametrede de REP grubunda en yüksek iken SHAM grubunda en düşük değerlere sahipti ve SİR, TİR ve STİR gruplarının üçü de REP grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Bu sonuçlar

yaptığımız histopatolojik değerlendirme ile de uyumluydu. Ayrıca nörolojik muayene skorlarımız da benzer sonuçlar vermiş ancak SİR, TİR ve STİR grubundaki düşüklük anlamlı bulunmadı. Kimyasal parametrelerden ise, TAS'da SİR ve TİR grubunun antioksidan düzeyini REP grubuna oranla anlamlı derecede yükselttiği görüldü. TMAO sonuçlarımız değerlendirildiğinde ise STİR grubunda REP ve SHAM gruplarına kıyasla serum TMAO düzeylerinde anlamlı bir düşüş olup, silimarin ve timokinonun kombine kullanımının TMAO seviyesini düşürmede daha etkili olabileceği düşünüldü.

Devedikeninin etken maddesi olan silimarinin karaciğer hastalıklarındaki koruyucu ve destekleyici rollerinin yanı sıra antidiyabetik, antiviral, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, antikanser gibi birçok etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Ayrıca serebral İ/R hasarında faydalı olabilecek antioksidan, antinflamatuar, apopitoz indükleyici, nöroaktif, nöroprotektif etkilerinin olduğunu bildirmiştir (Rui ve ark 1990, Kren ve Walterova 2005, Kazazis ve ark 2014, Neha ve ark 2016, Ghobadi Pour ve ark 2017, Taleb ve ark 2018, Liu ve ark 2019).

Silimarinin oldukça güvenli bir madde olarak kabul edilmektedir. Suda çözünmeyen yapısı nedeniyle bitkisel çay olarak tüketilemez ancak bitki ekstresi kapsül formları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar oral alımlar sonrası maksimum plazma konsantrasyonuna 4-6 saatte çıktığını göstermiştir. Yarılanma ömrü 6-8 saattir ve esas olarak safra yoluyla ve bir miktar da böbrekler yoluyla atılmaktadır (Morazzoni ve ark 1993). Bir çalışmada intravenöz infüzyondan sonra LD50 değerleri farelerde 400 mg/kg, sıçanlarda 385 mg/kg olarak bildirilmiştir. Ancak infüzyon hızına bağlı olarak bu değerler değişebilir. Yavaş infüzyonla (2-3 saatin üzerinde) verildiğinde, sıçanlarda 2 g/kg'lık değerler kaydedilebilir. Oral uygulamadan sonra tolerans, 10 g/kg'ın üzerinde değerlere çıkmaktadır. Açıklanan klinik çalışmalarda, kullanılan günlük oral silimarin dozu 100 ila 800 mg arasında değişmektedir (Fraschini ve ark 2002).

Literatürde serebral İ/R hasarı çalışmalarında silimarin serbest formunun dozu 100 ila 400 mg/kg/gün nanopartiküle bağlanmış formların dozu ise 1 ila 15 mg/kg/gün şeklinde 1, 3, 7 veya 14 gün sürelerle uygulanmıştır (Rui ve ark 1990, Raza ve ark 2011, Muley ve ark 2012, Muley ve ark 2013, Wang ve ark 2016, Gupta ve Gupta 2017, Moghaddam ve ark 2020, Rathore ve ark 2020, Mokhtari Sangdehi ve ark 2021).

Çalışmamızda SİR grubuna BCCAO uygulamasından önce 14 gün boyunca en sık tercih edilen doz olan 200 mg/kg/gün Silimarin (ip) verildi.

Timokinon üzerine yapılan çalışmalarda ise; antioksidan, antihistaminik, antiinflamatuar, gastroprotektif, antidiyabetik, hepatoprotektif ve immun sistemi güçlendirici etkileri bildirilmiştir (El-Mahmoudy ve ark 2002, Ali ve Blunden 2003, Salem 2005, Al-Enazi 2007, Ragheb ve ark 2009, Attia ve ark 2010, Fararh ve ark 2010, Meydan ve ark 2019). Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apopitozu da önlediği gösterilmiştir (Bouhlel ve ark 2017). Bunlar dışında sinaptik toksisiteye, I/R hasarına ve nöron apopitozuna karşı koruyucu etkilerini bildiren çalışmalar mevcuttur (Hosseinzadeh ve ark 2007, Ullah ve ark 2012, Alhebshi ve ark 2014).

Timokinon hidrofobik bir molekül olduğundan çözünürlüğü, biyoyararlanımını etkileyebilecek ve ilaç formülasyonunda sınırlamalara neden olur ve timokinonun LD50'si de, uygulama yoluna ve kullanılan araca bağlı olarak değişiklik gösterir (Ahmad ve ark 2019). Bir çalışmada sıçanlara ip olarak enjekte edildiğinde TQ için 10 mg/kg'lık bir LD50 bildirmiştir (el-Dakhakhny 1965). Başka bir çalışmada ise LD50 değeri sıçanlarda oral ve ip uygulamadan sonra sırasıyla 794.3 mg/kg ve 57.5 mg/kg olarak bildirilmiştir (Al-Ali ve ark 2008).

Literatürde timokinon ile yapılan çalışmalarda 2,5 5 ve 10 mg/kg gün dozlar po veya ip olarak kullanılmış, 5 mg/kg ve altındaki dozlarda toksik etkiye daha az rastlanmıştır (Al-Majed ve ark 2006, Hosseinzadeh ve ark 2007, Silachev ve ark 2015, Fan ve ark 2020, Tian ve ark 2020). Çalışmamızda TİR grubuna BCCAO uygulamasından önce 14 gün boyunca en sık tercih edilen doz olan 3 mg/kg/gün timokinon (ip) verildi.

Çalışmalarda silimarin ve timokinon po, ig veya ip olarak verilmiştir. Biz de çalışmamızda uygulama kolaylığı açısından ip uygulamayı tercih ettik.

Literatürde BCCAO, MCAO veya başka bir serebral iskemi yöntemiyle silimarin ve timokinonun kıyaslandığı veya kombine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak Karabağ ve Koçarslan'ın ekstremitede oluşturulan İ/R'yi takiben beyinde silimarin ve timokinonun etkilerini kıyasladıkları bir

çalışmaları mevcuttur (Karabag ve Koçarslan 2019). Çalışmada tek seferlik 200 mg/kg silimarin ve 20 mg/kg timokinon ip uygulanan gruplar kıyaslanmıştır. İki maddenin kombine verildiği bir grup bulunmamaktadır. Silimarin ve timokinonun kombine kullanımında koruyucu etkilerini gözlemlemek istediğimiz çalışmamızda STİR grubuna BCCAO uygulamasından önce 14 gün boyunca en sık tercih edilen dozlar olan 200 mg/kg/gün silimarin ve 3 mg/kg/gün timokinon birlikte ip olarak verildi.

İskemi-reperfüzyon çalışmalarında her zaman nörolojik bir muayene kullanılmamaktadır. Longa ve arkadaşlarının oluşturduğu 5 puanlı bir skor çeşitli İ/R çalışmalarında kullanmışlardır (Longa ve ark 1989, Muley ve ark 2012, Wang ve ark 2016, Hou ve ark 2020). Ayrıca Garcia'nın davranış puanını veya Bederson'ın nörolojik fonksiyon testini kullanan çalışmalar da mevcuttur (Hou ve ark 2010, Gupta ve Gupta 2017). Ancak bu çalışmaların tamamı MCAO modeli üzerinde çalışmışlardır. Skorlamalar da tek taraflı hasara göre dizayn edilmiştir. Toklu'nun modifiye nörolojik muayenesi ise, Garcia'nın davranış puanının ve Bederson'ın nörolojik fonksiyon testinin modifiye edilmiş birleşimidir ve denge, kas gücü, koordinasyon ve refleks değerlendirmesinin bir kombinasyonudur (Toklu ve ark 2019). Bu nedenle kolay bir düzenekle ve kısa sürede oldukça kapsamlı bir nörolojik değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Biz de çalışmamızda deney gruplarının klinik durumunu saptamak için Toklu'nun modifiye nörolojik muayenesini kullandık (Toklu ve ark 2019).

Long Evans sıçanlarda MCAO modeli uygulayan ve silimarinin etkilerini inceleyen bir çalışmada Garcia’nın davranışsal puanının modifiye hali kullanılmış, Silimarinin ön tedavi olarak (iskemiden 15 dk önce) verildiği grupta MCAO grubuna göre nörolojik defisitlerde anlamlı derecede düzelme bildirilmiş ($p<0,05$). Ancak iskemiden sonra (60 dk) uygulanan Silimarin gruplarıyla MCAO grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Hou ve ark 2010). Bizim çalışmamızda da Silimarin ön tedavi olarak verilmiş, ancak silimarin verilen grupların skorları REP grubundan düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır.

Muley ve arkadaşlarının çalışmasında MCAO modeli uygulanan erkek Wistar albino sıçanlarda 5 skorlu nörolojik muayene değerlendirilmiş, silimarin (100 ve 200 mg/kg) ile tedavi iskemik sıçanlara kıyasla doza bağımlı olarak motor fonksiyon

açısından önemli ölçüde gelişmiş bir nörolojik skor gösterdiği bildirilmiştir ($p<0,01$) (Muley ve ark 2012).

MCAO modeli uygulanan erkek Wistar albino sıçanlarda, silimarinin etkilerini inceleyen iki farklı çalışmada nörodavranışsal aktivite için 5 puanlı spontan motor aktivite testi ile skorlanmıştır. Her iki çalışmada da silimarin uygulanan grupların MCAO grubuna göre anlamlı derecede daha düşük skorlara sahip olduğu bildirilmiştir ($p<0,05$) (Raza ve ark 2011, Rathore ve ark 2020).

Farelerde MCAO uygulayan başka bir çalışmada 200mg/kg ig silibinin uygulanan farelerde Longa'nın nörolojik skoru uygulanmayan gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$) (Wang ve ark 2016).

Gupta ve arkadaşları MCAO modeli uygulanan erkek Wistar albino sıçanlarda Bederson'un nörolojik skorunu kullanmış silimarin (250 mg/kg) ile tedavi edilen gruplarda nörolojik defisit skorunda önemli bir azalma gözlemlenmiştir ($P<0.05$) (Gupta ve Gupta 2017).

Sıçanlarda MCAO uygulayan ve Longa'nın nörolojik skorunu kullanan bir çalışmada model grubunda nörolojik defisitin anlamlı derecede arttığını timokinonun uygulanan grubun model grubuna göre nörolojik performansı iyileştirdiği bildirilmiştir ($p<0,05$) (Fan ve ark 2020). Başka bir çalışmada ise, Bederson'un nörolojik defisit skoru kullanılmış ve 2.5 mg/kg ($p<0,05$) veya 5 mg/kg ($p<0,001$) timokinon uygulamasının, serebral İ/R hasarından sonra nörolojik defisitleri önemli ölçüde azaltığı bildirilmiştir (Tian ve ark 2020). Bizim çalışmamızda da timokinon verilen grupların skorları REP grubundan düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır.

Literatürde BCCAO, MCAO veya başka bir serebral iskemi yöntemiyle silimarin ve timokinonun kıyaslandığı veya kombine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanamamıştır. Çalışmamızda Garcia'nın davranış puanının ve Bederson'ın nörolojik fonksiyon testinin modifiye edilmiş birleşimi olan Toklu'nun modifiye nörolojik muayene skorlaması kullanılmış olup literatürle uyumlu olarak SİR, TİR ve STİR gruplarının nörolojik hasar skorları REP grubuna göre azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel bir fark oluşturamamıştır. Bunun nedeni model olarak

kullandığımız BCCAO'nun bölgesel değil daha yaygın bir iskemiye neden olması, nörolojik muayene için beklediğimiz sürenin (24 saat) kısa olması, bireysel farklılıklar, genel olarak kullanılan 5 skorlu bir muayene yerine 20 skorlu bir muayenenin kullanılmış olması olabilir.

Ayrıca yaygın beyin hasarı sonucu otonom sinir sistemi aktivitesindeki değişikliklere bağlı olarak davranışsal sonuçlar her zaman histolojik değişikliklerle uyumlu olmayabileceği, dolayısıyla dokularda nöroproteksiyon elde edilmiş olsa bile, bu önemli ölçüde daha iyi bir nörolojik skorla sonuçlanmayabileceği bildirilmiştir (Toklu ve ark 2019).

İskemi-reperfüzyon hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde en çok başvurulan yöntem H&E boyamadır. Silimarin ve timokinonun İ/R hasarı üzerine etkilerini araştıran pek çok çalışma da histopatolojik değerlendirme için H&E boyamayı tercih etmiştir. TB histopatolojik değerlendirmede kullanılabilecek kolay uygulanan alternatif bir yöntemdir. Literatürde İ/R çalışmalarında sık kullanılmasa da sinir sisteminde özellikle periferik sinirlerde kullanılmakta ayrıca apopitoz değerlendirmesinde de kullanılabilmektedir (Elmore 2007, Ghnenis ve ark 2018). Çalışmamızda H&E ile değerlendirmeye ek olarak TB ile de değerlendirme yapıldı.

Silimarinin etkilerini inceleyen bir çalışmada histopatolojik değerlendirmede MCAO grubunda bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde nöronal kayıp ve çok sayıda vakuollü boşluklar mevcut iken sağlam nöronların bulunmadığı, silimarin uygulanan grupta kısmi nöronal kayıp ve vakuollü boşluklar arasında sağlam nöronların da olduğu Sham grubunda ise patolojik değişiklik olmadığı ve nöronların sağlam göründüğü bildirilmiştir (Raza ve ark 2011).

Muley ve arkadaşlarının iki farklı çalışmasında BCCAO ve MCAO ile İ/R sonrası hipokampüsün histopatolojik incelemesinde, araçla İ/R grubunda hafif derecede fagositoz ile birlikte hipoksik değişiklikler, konjesyon, vakuolar değişiklikler ve nöronların şişmesi gibi çeşitli patolojik değişiklikler tespit edilirken, silimarin (100 ve 200 mg/kg) ile tedavi edilen sıçanlar, İ/R grubuna kıyasla histopatolojik değişikliklerde gelişme gösterdiği bildirilmiştir (Muley ve ark 2012). Benzer şekilde biz de çalışmamızda 200 mg/kg silimarin dozunda histopatolojik hasarda azalma olduğunu tespit ettik.

Silimarinin en aktif bileşeni olan silibinin MCAO modelinde koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada histopatolojik değerlendirmede Sham grubunun hipokampus ve prefrontal korteksindeki normal nöronlar, sınırları belirgin çekirdekleri ile sıkı ve düzenli bir şekilde paketlenmiş olarak değerlendirildiğini, MCAO grubunda küçülmüş çekirdeklerle karakterize birçok sağlıksız nöronların mevcut olduğunu bildirmiştir. Çalışmanın verilerine göre normal nöron sayısı, MCAO'dan sonra hipokampusta ve prefrontal kortekste düşmüştür ($p<0,01$). Ancak, normal hücreler Silibinin ile tedavi edilen gruptan hipokampusta ve prefrontal kortekste MCAO ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır ($p<0,01$) (Wang ve ark 2016). Silibininin bu etkisi çalışmamızda silimarinin uygulanan gruplarda (SİR, STİR) gördüğümüz iyileşme ile örtüşüyordu.

BCCAO sıçan modeliyle çalışan Hirayama ve arkadaşları iskemiden hemen önce ve hemen sonra 200 mg/kg po silimarin verdikleri çalışmada Sham grubu ile karşılaştırıldığında, pre-, post- ve kontrol gruplarının hipokampüsündeki CA1 piramidal hücrelerin hücre yoğunlukları açıkça düşük olduğunu bunun hücre ölümünün ameliyat nedeniyle gerçekleştiğinin göstergesi olduğunu bildirmişler. Ancak çalışmamızın aksine pre- ve post silimarin verdikleri gruplar ile sadece BCAAO uyguladıkları gruplar arasında morfolojik bir fark bildirmemişlerdir. Silimarinin tek doz ve oral uygulanması nöroprotektif etkilerinin morfolojiye yansıması için yeterli olmamış olabilir.

Rathore ve arkadaşları MCAO modelinde iskemi öncesi 7 gün süreyle uygulanmış serbest silimarin (100 mg/kg) ile çeşitli dozlarda kollajen nanopartiküle bağlanmış silimarin (10, 100, 1000 μg/kg)'in etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada nanopartiküle bağlanmış silimarin verilen tüm gruplarda iyileşme bildirirken çalışmamızın aksine serbest silimarin verilen grupta histopatolojik bir düzelme bildirmemişlerdir (Rathore ve ark 2020). Bunun nedeni dozun düşüklüğü, sürenin kısalığı veya bireysel farklılıklar olabilir. Ayrıca çok daha düşük dozlarda olan nanopartiküle bağlanmış silimarinin etkili olması nanopartikülün silimarinin biyoyararlanımını arttırdığı düşündürebilir.

Al-Majed ve arkadaşlarının çalışmasının histopatolojik değerlendirmelerinde timokinon (5 mg/kg 5 gün po) ön tedavisinin, ön beyin iskemisinin neden olduğu

nöronal hasarı hafiflettiği, ölü hipokampal nöron hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir ($p < 0,001$) (Al-Majed ve ark 2006).

Sıçanlarda MCAO uygulayan bir çalışmada timokinon uygulanan grubun hipokampüs CA1 bölgesinin histopatolojik incelemesinde morfoloji ve nöron sayısının model grubuna göre daha korunmuş olduğu bildirilmiştir (Fan ve ark 2020). Benzer şekilde, sıçanlarda MCAO uygulayan başka bir çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde sham grubunda hasarsız, hücre sınırları açık tam hücre morfolojisi olan, çok sayıda sağlıklı hücre ile görülürken, MCAO sıçanlarında korteksin iskemik penumbrasında, düzensiz hücreler, hücre dışı matriste çok sayıda vakuol, azalmış hücre sayısı, değişmiş hücre morfolojisi, piknoz ve derin nükleer boyama ile ciddi hücre hasarı tespit edilmiştir. 5 mg/kg timokinon uygulanan grupta ise denatüre hücre indeksi (DCI) MCAO grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tian ve ark 2020). Her iki çalışmanın da bulguları bizim çalışmamızla uyumludur.

Literatürde BCCAO, MCAO veya başka bir serebral iskemi yöntemiyle silimarin ve timokinonun kıyaslandığı veya kombine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak Karabağ ve Koçarslan, ekstremitede oluşturulan iskemi reperfüzyonu takiben beyinde de doku hasarı meydana geldiğini ve timokinon ve silimarin'in bu hasarı önlemede oldukça etkili olduğu bildirmiştir. Histopatolojik hasar skoru değerlendirmesinde ise silimarin ve timokinon gruplarında hasarın önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Karabag ve Koçarslan 2019). Ancak herhangi birinin üstünlüğünden bahsedilmemiş veya kombine etkileri araştırılmamıştır.

GFAP yetişkin beynindeki ana ara flament proteinidir ve olgun astrositlerde karakteristik bir proteindir. Beyin hasarı veya MSS dejenerasyonu sırasında indüklendiği ve yaşlı beyinde daha yüksek oranda eksprese edildiği bilinen astrositlerin bir belirteci olarak kabul edilir (Middeldorp ve Hol 2011).

İskemik beyin hasarında nöron dejenerasyonuyla ve astrosit aktivasyonu birlikte görülmektedir. Aktive astrositlerin iskemik inmeden sonra nöronların korunması için zararlı mı yoksa faydalı mı olduğu henüz bilinmemekle beraber son çalışmalar, enfarktüs boyutunu küçültebilen tedavilere sıklıkla zayıflatılmış astrosit yanıtlarının eşlik ettiğini göstermiştir (Fang ve ark 2006, Wang ve ark 2008, Liu ve Chopp 2016).

GFAP-/- farelerde serebral iskemiye yüksek duyarlılık tespit edilmiş bu da iskemik beyin hasarının ilerlemesinde astrositlerin ve GFAP'ın önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür (Nawashiro ve ark 1998). Genel olarak BOS'ta ve beyin dokusunda yüksek GFAP seviyeleri, beyin enfarktüsü, travmatik beyin hasarı gibi akut merkezi sinir sistemi hasarı durumlarında görülmüştür (Aurell ve ark 1991, Hausmann ve ark 2000). Astrosit aktivitesi, temel olarak, ana ara filament proteini olan GFAP'nin ekspresyonu ile karakterize edilir. GFAP'ın aşırı ekspresyonunun, beyin iskemik yaralanmalarından sonra astrositlerin morfolojik değişikliklerinde rol oynadığı bilinmektedir (Mao ve ark 2012).

Birçok çalışma, astrositleri görselleştirmek için GFAP antikorlarını kullanır (Mirarab ve ark 2019). GFAP immün boyama, astrositler için karakteristik olan yıldız şeklinde bir morfolojiye sahip hücreleri ortaya çıkarır. Astrositlerin yüksek büyütmeli görüntüleri GFAP immünoreaktivitesinin esas olarak perinükleer bölgede ve kalın uzantılarda mevcut olduğunu göstermiştir (Suzuki ve ark 2003, Middeldorp ve Hol 2011).

Çoğalan GFAP (+) astrositlerin sayısının iç içe geçmiş anatomik ilişkileri nedeniyle ölçülmesi zor olduğundan ve astrositler aktive olunca sadece sayıca artmayıp morfolojik olarak da genişlediğinden GFAP immünreaktivitesini incelemek için hücre sayımı yerine alan hesaplamasını tercih ettik (Wang ve ark 2008).

Silimarin ve/veya timokinonun serebral İ/R hasarında etkilerini araştıran birçok çalışma mevcut olsa da astrositler üzerine etkisini ve GFAP düzeylerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda İ/R hasarının ve silimarin ve timokinon uygulamalarının astrosit aktivasyonu üzerine etkisini görmek için GFAP frontal kortekste ve serebellumda immünfloresan olarak işaretlenmiş ve ekspresyon olan alanlar toplam alanla oranlanarak gruplar kıyaslanmıştır.

Hem frontal kortekslerin değerlendirilmesinde hem de beyincikte moleküler tabaka, granüler tabaka ve beyaz cevher değerlendirmelerinde tüm gruplar REP grubuna göre daha düşük değerlere sahipti ($p<0,05$). Ancak hepsinde STİR grubu daha düşük değerlere sahip olmasına rağmen, STİR, SİR ve TİR grupları arasında anlamlı

bir fark tespit edilemedi. Buna göre silimarinin ve timokinonun astrosit aktivasyonunu azalttığını söyleyebiliriz. Ancak silimarinin timokinon ile kombine kullanımının astrosit aktivasyonu üzerine etkisini anlamlı derecede arttıramadığı görülmüştür.

Kaspaz-3, hem ekstinsik yol üzerinden Kaspaz-8 ile aktive edilebildiği gibi intrinsik yol üzerinden Kaspaz 9 ile de aktive edilebilir (Broughton ve ark 2009). Kaspaz aktivasyonu, western blot, immünopresipitasyon ve immünohistokimya gibi çeşitli şekillerde tespit edilebilir. Kaspazların ve kaspaz 3'ün aktivasyonunun değerlendirilmesi apopitoz değerlendirilmesinde sıkça başvurulan bir yöntemdir (Fabres ve ark 2020, Liu ve ark 2020, Dasdelen ve ark 2021). Kaspaz aktivasyonunun mutlaka apopitozun gerçekleştiğini göstermemesi ise bir dezavantajdır (Elmore 2007, Obeng 2021). Başka belirteçlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda deney gruplarında serebrum ve serebellumdaki apopitotik durumu değerlendirmek üzere Kaspaz 3 aktiviteleri immunfloresan mikroskopla değerlendirilmiş ve kaspaz 3 pozitif hücreler Image J programı yardımıyla sayılmıştır.

Raza ve arkadaşlarının çalışmasında Sham grubuna kıyasla MCAO grubunda mikroplate reader ile ölçtükleri kaspaz-3 aktivitesinin önemli ölçüde arttığı ($p<0,01$), silimarin uygulamasıyla MCAO grubuna kıyasla önemli ölçüde korunduğu bildirilmiştir ($p<0,05$). Aynı çalışmada kaspaz 9 da immünohistokimyasal olarak incelenmiş olup kaspaz 3 sonuçlarıyla uyumlu olarak Sham grubuna kıyasla MCAO grubunda kaspaz-9 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını ve silimarin uygulamasıyla önemli ölçüde azaltıldığını bildirmişlerdir (Raza ve ark 2011). Çalışmamızda da benzer şekilde silimarin uygulanan grupların kaspaz-3 aktivitesini azalttığını tespit ettik.

Rathore ve arkadaşlarının çalışmasında bizim sonuçlarımıza benzer şekilde kaspaz-3'ün ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla MCAO grubunda önemli ölçüde yükselmiş ($p <0,001$), nanosilimarin ile muamele edilmiş gruplarda MCAO grubuna kıyasla önemli bir azalma göstermiştir ($p<0,001$). Ayrıca serbest silimarin ile tedavi edilen grup da MCAO grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonda ($p<0,05$) önemli bir farklılık göstermiştir. Ancak bu azalma nanosilimarin grupları kadar fazla değildi (Rathore ve ark 2020). Nanosilimarinin bu üstünlüğü silimarin kullanımında nanopartikülün kullanışlı bir taşıyıcı olabileceğini göstermektedir.

Bir başka çalışmada I/R indüksiyonunun, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RNA düzeyinde kaspaz-3 ekspresyonunda önemli bir artışa ($p < 0.001$) neden olduğu, Silimarin ve nanosilimarin ön tedavilerinin, I/R grubuna kıyasla Kaspaz-3 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ($p < 0.001$) bildirilmiştir (Mokhtari Sangdehi ve ark 2021). RNA düzeyinde ekspresyonun değerlendirildiği bu bulgular bizim doku düzeyinde ekspresyonu değerlendirdiğimiz bulgular ile uyumludur.

Timokinonun serebral İ/R hasarında etkilerini araştıran birçok çalışma mevcut olsa da apopitotik aktiviteyi değerlendirmek için kaspaz 3 veya diğer kaspazları değerlendiren bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Çalışmamızda Kaspaz-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde REP grubunun en yüksek, SHAM grubunun ise en düşük kaspaz-3 pozitif hücre oranlarına sahip olduğu, SİR, TİR, STİR gruplarının üçünün de kaspaz-3 pozitif hücre oranlarının REP grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu üç grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu bulgular silimarin ve timokinonun apopitoza karşı koruyu etkileri olduğunu desteklemekle birlikte kombine kullanımının ek bir faydası olduğuna dair bir kanıt sunmamaktadır.

TUNEL 3-OH uçlarının etiketleyerek DNA kırıklarını belirleyerek kullanılan bir apopitoz belirtecidir. Apopitoz için oldukça iyi bir belirteç olan TUNEL oldukça hassastır, floresan mikroskobu ile tek bir hücrenin veya akış sitometrisi yoluyla yaklaşık 100 kadar hücrenin saptanmasına izin verir. Aynı zamanda hızlı bir tekniktir ve birkaç saatte tamamlanabilmektedir (Elmore 2007, Obeng 2021). MSS'de İ/R modeli oluşturulan birçok çalışmada apopitoz değerlendirmesi için TUNEL tercih edilmektedir (Hirayama ve ark 2016, Chen ve ark 2018, Deng ve ark 2019, Fan ve Zhou 2021, Gunduz ve ark 2021).

Çalışmamızda deney gruplarında serebrum ve serebellumdaki apopitotik durumu değerlendirmek üzere TUNEL aktiviteleri floresan mikroskopla değerlendirilmiştir.

Hirayama ve arkadaşlarının çalışmasında BCCAO modelinde silimarinin apopitoz üzerine etkileri değerlendirilirken TUNEL metodu kullanılmış, sham grubu hariç tüm deney gruplarında apopitoz ile hücre ölümü olduğu, İ/R grubuna kıyasla

önce ve sonrasında silimarin verilen gruplarda apopitotik hücre ölümlerinin sayısının kontrol grubuna göre azaldığı bildirilmiştir (Hirayama ve ark 2016).

Timokinonun serebral İ/R hasarında apopitoz üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma mevcut olsa da TUNEL metodunu kullanan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

TAS ve TOS'un ölçümleri ve TOS'un TAS'a oranı olan OSI sıkça kullanılan bir oksidatif stres belirteçleridir (Wu ve ark 2017). İskemi reperfüzyon çalışmalarında oksidan antioksidan durumunu değerlendirmek için TAS, TOS ve OSI değerleri sıklıkla kullanılmıştır (Ayada ve ark 2015, Oruc ve ark 2016, Kumas ve ark 2017, Doğan ve ark 2019, Gunduz ve ark 2021).

Serebral İ/R çalışmalarında oksidatif stresi ölçmek için TAS, TOS, OSI değerleri sıklıkla kullanılsa da silimarin ve/veya timokinonun serebral İ/R hasarında oksidatif stres düzeyi üzerine pek çok çalışma yapılmış ancak TAS, TOS, OSI değerleri kullanılmamıştır. TAS, TOS ve OSI dışında oksidatif stresi değerlendirmek için oksidan ve antioksidan özellikte olan pek çok parametre de ölçülebilmektedir. MDA, SOD, LT, GSH bunlardan bazılarıdır.

Rui ve arkadaşları Moğolistan gerbilleri üzerinde BCCAO modelinde İ/R hasarı sonrası beyinde anlamlı derecede antioksidan özellikteki SOD ve LT azalması, ayrıca oksidan olan MDA artışı oluşturduğunu göstermişlerdir. 30 dk önce ip verilen 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda silibininin ile beyin dokusunda SOD düzeyi arttığı ve MDA azaldığı, LT'in ise, 200 mg/kg silibinin dozundan sonra beyin dokusunda azaldığı bildirilmiştir (Rui ve ark 1990). Çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olacak şekilde silimarin ve timokinon uygulanan gruplarda TAS değerleri artmıştır ($p<0,05$).

Silimarin ile silibininin etkilerini kıyaslayan bir çalışmada silimarinin hasarlı dokularda İ/R kaynaklı MDA ve NT oluşumunun yanı sıra süperoksit anyon üretimini büyük ölçüde önlediği ancak silibininin anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir (Hou ve ark 2010). Çalışmamızda silibinin incelenmemiştir, silimarinin benzer etkisi gözlenmiştir.

Raza ve arkadaşları silimarinin antioksidan düzeyi arttırmada başarılı olduğunu bildirmiştir. Silimarin uygulanan grubun MCAO grubuna kıyasla striatum ve frontal kortekste GSH seviyelerini, Na^+-K^+ ATPaz aktivitesini, antioksidan enzimler olan GR

(Glutatyon Redüktaz), GPx (Glutatyon Peroksidaz) ve SOD (Süper Oksit Dismutaz) seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir ($p<0,005$) (Raza ve ark 2011). Çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olacak şekilde silimarin ve timokinon uygulanan gruplarda TAS değerleri artmıştır ($p<0,05$).

Muley ve arkadaşlarının çalışmasında global İ/R sonrası beynin antioksidan savunma sisteminde önemli değişiklikler MDA oluşumunda artış, nitrit içeriğinde artış ve GSH, SOD ve CAT (katalaz)'da azalmaydı. Silimarin (200 mg/kg, p.o.) ile yapılan tedaviler, tükenmiş antioksidan enzimleri geri yükleyebildiği ve yüksek MDA ve nitrit içeriğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir ($p<0,05$) (Muley ve ark 2013).

Bir başka çalışmada silimarin ön tedavisinin, MCAO grubuna kıyasla SOD düzeylerinde belirgin artış, MDA (Malondialdehit) ve NO (Nitrik Oksit) düzeylerinde de belirgin bir azalma sağlayarak farklı beyin bölgelerindeki oksidatif stresi iyileştirdiği bildirilmiştir ($p<0,05$) (Gupta ve Gupta 2017).

Rathore ve arkadaşlarının çalışmasında antioksidan enzimler olan GR, GPx , CAT seviyeleri MCAO grubu sıçanlarda kontrol grubu sıçanlarına göre önemli ölçüde azaldığı, serbest silimarin ile tedavi edilen grubun, MCAO grubuna kıyasla tüm antioksidan enzimlerde (GR, GPx, SOD, CAT) artmış aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Rathore ve ark 2020).

Başka bir çalışmada İ/R indüksiyonu, kontrol grubuna kıyasla MDA seviyelerinde önemli bir artışa ($p<0,001$) ve GSH seviyelerinde önemli bir düşüşe ($p<0,05$) neden olduğu, serbest silimarin ve nanopartiküle bağlı silimarin ön tedavilerinin, I/R grubuna kıyasla MDA anlamlı derecede düşmüştür ($p<0,001$). Öte yandan, sadece nanopartiküle bağlı silimarin grubu GSH seviyelerinde anlamlı artış ($p<0,001$) göstermiştir. SOD, CAT, GPx ve GRx aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla İ/R sıçanlarında önemli ölçüde azaldığı, nanopartiküle bağlı silimarin ön tedavisinin bu aktiviteleri önemli ölçüde arttırdığı, ancak serbest silimarin ön tedavisinin CAT, GPx ve GRx aktiviteleri üzerinde anlamlı bir etki göstermediği bildirilmiştir (Moghaddam ve ark 2020).

Nanopartiküle bağlı silimarinlerle çalışan başka bir çalışmada antioksidan enzimlerin aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda önemli ölçüde azaldığı

($p<0,01$), nanopartiküle bağlı silimarin grubunun tüm enzimlerin aktivitesini arttırırken, serbest silimarin grubunun, İ/R grubuna kıyasla sadece SOD aktivitesi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir ($p<0,05$) (Mokhtari Sangdehi ve ark 2021). Bu iki çalışma her ne kadar nanopartiküle bağlı silimarinin üstünlüğünü vurgulasa da bulguları genel olarak çalışmamızla uyumludur.

Global serebral İ/R hasarında timokinon ve çörek otu tohumu yağının sıçan hipokampüsünde lipid peroksidasyon düzeyi üzerine etkisi araştıran bir çalışmada timokinon ve nigella sativa yağı ile ön tedavinin, iskemik grupla karşılaştırıldığında MDA seviyesinde önemli bir düşüş sağladığı bildirilmiştir (Hosseinzadeh ve ark 2007).

Ayrıca, iskemik sıçanların timokinon ile ön tedavisi, yüksek malondialdehit seviyelerini azalttığı ve GSH içeriğini, katalaz ve SOD aktivitelerini normal seviyelere yükselttiği bildirilmiştir (Al-Majed ve ark 2006).

Çalışmamızda; TAS değerleri SİR ve TİR grubunda REP grubuna kıyasla artmıştı ($p<0,05$). TOS ve OSI değerlerinde ise diğer gruplarda REP grubuna göre azalma olmasına rağmen bu fark anlamlı değildi. Bu değerlerde anlamlı sonuç bulunamamasının nedeni beyinde oluşan oksidatif stresin henüz kandaki biyokimyasal değerlere yansımamış olması olabilir.

Daha çok mikrobiyata ve kalp hastalıklarıyla ilişkilendirilen TMAO'nun MSS'deki rolü yeterince araştırılmamıştır. Yüksek TMAO seviyelerinin, artan inme riski ve daha kötü nörolojik defisit ile ilişkili olduğu, TMAO'yu artıran kronik diyet maruziyetlerinin iskemik inmeye doğrudan katkıda bulunabileceği bildirmiştir (Rexidamu ve ark 2019). Ayrıca plazma TMAO seviyelerinin, tekrarlanan serebral İ/R'ye maruz kalan farelerde yükseldiği gösterilmiştir (Liu ve ark 2020). Ancak çalışmamızda sıçanlarda 30 dk BCCAO sonrası TMAO seviyelerinde bir artış tespit edilememiştir.

Bir çalışmada yüksek TMAO düzeylerinin, claudin-5 ve zonula oklüdens (ZO) gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak kan beyin bariyerinin bozulması yoluyla inme sonrası hastalarda serebral küçük damar disfonksiyonunun ilerlemesine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Liu ve Huang 2015).

Silimarin ve/veya timokinonun serebral İ/R hasarındaki etkilerini araştıran birçok çalışma mevcut olsa da bu maddelerin TMAO düzeyleri ile bir ilişkisi olup olmadığı henüz incelenmemiştir.

Çalışmamızda silimarin ve timokinonun TMAO düzeyleri üzerine etkisi olup olmadığını ve TMAO seviyelerinin nöron hasarı düzeyiyle ilişkili olup olmadığını görmek için deneklerin serumlarından TMAO ölçümleri de yapılmış ve değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda herhangi bir etken madde verilmeyen REP ve SHAM grupları en yüksek TMAO değerlerine sahipti ve aralarında anlamlı fark yoktu. SİR, TİR ve STİR grubunda TMAO değerleri azalmış olmakla birlikte sadece STİR grubunda değerler REP ve SHAM gruplarına kıyasla azalmış bulundu ($p<0,05$). Her ne kadar silimarin ve timokinonun kombine kullanımı incelediğimiz diğer parametrelerin hiçbirinde ek bir fayda göstermese de TMAO değerlerini düşürmekte etkili olmuştur.

Tablo 4.1. Serebral İ/R hasarında silimarinin etkilerini araştıran çalışmalar.

ÇALIŞMA	MODEL/SÜRE	DENEK	UYGULANAN DOZ	NÖROLOJİK MUAYENE	HİSTO PATOLOJİ	ASTROSİT AKTİVASYONU	APOPİTOZ	OKSİDATİF STRES	TMAO
RUİ VE ARK (1990)	BCCAO 30dakika/2dakika	Moğolistan gerbili	100, 200, 400 mg/kg silibinin 30 dakika önce	yok	yok	yok	yok	SOD, MDA, LT	yok
HOU VE ARK (2010)	MCAO/BCCAO 1 saat/24 saat	Long-Evans erkek sıçan 250-300 gr	1,5,10mg/kg 15 dakika önce/ 60 dakika sonra	Garcia	yok	yok	yok	MDA, iNOS, STAT	yok
RAZA VE ARK (2011)	MCAO 2 saat/22 saat	Wistar albino erkek sıçan 240-260 gr	200 mg/kg po 15 gün	SMA	Korteks H&E	yok	Kaspaz 3 Kaspaz 9	SOD, GR, GPx, GSH	yok
MULEY VE ARK (2012)	MCAO 1 saat/24 saat	Wistar-albino erkek sıçan 150-180 gr	50,100,200mg/kg po 7 gün	Elango	Hipokampüs H&E	yok	yok	yok	yok
MULEY VE ARK (2013)	BCCAO 30 dakika/24 saat	Wistar-albino sıçan 150-180 gr	50,100,200mg/kg po 7 gün	yok	Hipokampüs H&E	yok	yok	MDA, GSH, SOD, CAT	yok
HİRAYAMA VE ARK (2016)	BCCAO 20 dakika/1 hafta	Sprague-Dawley erkek sıçan 250-300 gr	200 mg/kg Hemen önce/sonra	yok	H&E	yok	yok	yok	yok
WANG VE ARK (2016)	MCAO 2 saat/24 saat	C57BL6/J erkek fare 20-25 gr	200 mg/kg Silibinin 3 gün	5 skorlu	Hipokampüs Korteks H&E	yok	yok	yok	yok
GUPTA VE GUPTA (2017)	MCAO 2 saat/24 saat	Wistar-albino erkek sıçan 240-260 gr	250 mg/kg po 3 gün	Bederson	yok	yok	yok	NO, MDA, SOD	yok
RATHORE VE ARK (2020)	MCAO 1 saat/24 saat	Wistar albino erkek sıçan 250-300 gr	100 mg/kg ip 7gün	SMA Testi	Korteks H&E	yok	Kaspaz 3 (IH)	CAT, SOD, GSH	yok
MOGHADDAM VE ARK (2020)	BCCAO 5-10-5dakika/3gün	Wistar albino erkek sıçan 250-300 gr	15 mg/kg po 14 gün	yok	yok	yok	yok	GSH, MDA, CAT, SOD	yok
MOKHTARİ SANGDEHİ VE ARK (2021)	BCCAO 5-10-5dk /3gün	Wistar albino sıçan 240-260 gr	15 mg/kg po 14 gün	yok	yok	yok	Kaspaz 3	GSH, MDA, CAT, SOD	yok
BİZİM ÇALIŞMAMIZ (2021)	BCCAO 30 dakika/24 saat	Wistar sıçan-erkek-300-400 gr	SİR ve STİR 200 mg/kg ip14 gün	Toklu	serebrum serebellum H&E ve TB	anti-GFAP (IF)	anti-Kaspaz 3 TUNEL	Serum TAS, TOS, OSI	Serum TMAO

Tablo 4.2. Serebral İ/R hasarında timokinonun etkilerini araştıran çalışmalar.

ÇALIŞMA	MODEL/SÜRE	DENEK	UYGULANAN DOZ	NÖROLOJİK MUAYENE	HİSTO PATOLOJİ	ASTROSİT AKTİVASYONU	APOPİTOZ	OKSİDATİF STRES	TMAO
AL-MAJED VE ARK (2006)	BCCAO+hipotansiyon 10 dakika/7 gün	Wistar-albino Erkek sıçan 230-250 gr	5mg/kg po 5 gün	yok	Hipokampüs H&E	yok	yok	MDA, GSH, SOD	yok
HOSSEİNZADEH VE ARK (2007)	4 damar oklüzyon modeli	NMRI erkek sıçan 200-250 gr	2,5-5-10 mg/kg	yok	yok	yok	yok	MDA	yok
SİLACHEV VE ARK (2015)	MCAO 1saat/24 saat	Outbred beyaz erkek sıçan 320-350 gr	1µmol/kg ip reperfüzyondan hemen sonra	yok	yok	yok	yok	yok	yok
FAN VE ARK (2020)	MCAO 2 saat/ 24 saat	Sprague-Dawley erkek sıçan 280-300 gr	5 mg/kg ip 0 ve 12. saatte	Longa	H&E	yok	yok	yok	yok
TİAN VE ARK (2020)	MCAO	Sprague-Dawley erkek sıçan 210-230 gr	2,5-5mg/kg ip 7 gün	Bederson	Korteks H&E ve Nissl	yok	yok	yok	yok
BİZİM ÇALIŞMAMIZ (2021)	BCCAO 30 dakika/24 saat	Wistar albino Erkek sıçan 300-400 gr	TİR ve STİR 3 mg/kg ip 14 gün	Toklu	serebrum serebellum H&E ve TB	anti-GFAP (IF)	anti-Kaspaz 3 (IF) TUNEL	Serum TAS, TOS, OSI	Serum TMAO

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; sıçanlarda BCCAO modeli ile oluşturulan 30 dk iskemi- 24 saat reperfüzyonu nörolojik defisit skorunu arttırdığı, serebrum ve serebellum dokusunda genel histomorfolojik yapıyı bozduğu, apopitozisi göstergesi olan TUNEL pozitif ve kaspaz-3 ekspresyonunu ayrıca astrosit aktivasyonunun göstergesi olan GFAP ekspresyonunu belirgin olarak artırdığı görülmektedir.

Çalışmamızda silimarin ve/veya timokinon uygulamasının ise İ/R'de ortaya çıkan hasarı ve apopitotik hücre ölümünü (TUNEL) ve apopitoz intrinsik-ekstrinsik ortak yolu üzerindeki Kaspaz-3'ü baskılayabildiğini gösterilmiştir. Ancak silimarin ve timokinonun kombine kullanımının bu parametreler üzerinde daha etkili olduğu ispat edilememiştir.

İskemik beyin hasarında nöronal hasar ve astrositlerin reaktivitesi birlikte görülmektedir. Aktive astrositlerin iskemik inmeden sonra nöronların korunması için zararlı mı yoksa faydalı olduğu henüz bilinmemekle beraber son çalışmalar, enfarktüs boyutunu küçültebilen tedavilere sıklıkla zayıflatılmış astrosit yanıtlarının eşlik ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da silimarin ve/veya timokinon uygulamasının hücre hasarı ile birlikte astrosit aktivasyonunu (GFAP) da azalttığını görülmektedir. Ancak silimarin ve timokinonun kombine kullanımının bu parametreler üzerinde daha etkili olduğu ispat edilememiştir.

Daha çok mikrobiyata ve kalp hastalıklarıyla ilişkilendirilen TMAO'nun yüksek seviyelerinin, artan inme riski ve daha kötü nörolojik defisit ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda silimarin ve/veya timokinon uygulanan deneklerde TMAO değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir. Her ne kadar silimarin ve timokinonun kombine kullanımı incelediğimiz diğer parametrelerin hiçbirinde ek bir fayda göstermese de TMAO değerlerini düşürmekte tek tek kullanımlarından daha etkili olmuştur.

Çalışmadaki bulgular ışığında gelecekte daha ayrıntılı çalışmalarla iskemi riskini azaltmak ve komplikasyonlarını önlemek amacıyla silimarin ve timokinon içeren tedavi yaklaşımlarının denenebileceği, bu alanda yapılacak yeni çalışmalara çalışmamızın da önemli bir referans olabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Zaher AO, Mostafa MG, Farghly HM, Hamdy MM, Omran GA, Al-Shaibani NK, 2013. Inhibition of brain oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression by thymoquinone attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. Eur J Pharmacol, 702, 1-3, 62-70.

Adams JM, 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev, 17, 20, 2481-95.

Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhouri ZA, Anwar F, 2013. A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed, 3, 5, 337-52.

Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman MU, Qamar W, Khan AQ, Khan R, 2019. Thymoquinone (2-Isoprpyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. Saudi Pharm J, 27, 8, 1113-26.

Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA, 2008. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. J Ayub Med Coll Abbottabad, 20, 2, 25-7.

Al-Enazi MM, 2007. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. Pak J Biol Sci, 10, 18, 3115-9.

Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN, 2006. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol, 543, 1-3, 40-7.

Alhebshi AH, Odawara A, Gotoh M, Suzuki I, 2014. Thymoquinone protects cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against α-synuclein-induced synapse damage. Neurosci Lett, 570, 126-31.

Ali BH, Blunden G, 2003. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res, 17, 4, 299-305.

Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RM, Al-Shagha WM, 2015. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 40, 3, 319-23.

Ashkenazi A, Dixit VM, 1998. Death receptors: signaling and modulation. Science, 281, 5381, 1305-8.

Attia A, Ragheb A, Sylwestrowicz T, Shoker A, 2010. Attenuation of high cholesterol-induced oxidative stress in rabbit liver by thymoquinone. Eur J Gastroenterol Hepatol, 22, 7, 826-34.

Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG, 1991. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. Stroke, 22, 10, 1254-8.

Ayada C, Toru Ü, Genç O, Akcılar R, Şahin S, 2015. Balanced oxidative status by nesfatin-1 in intestinal ischemia-reperfusion. Int J Clin Exp Med, 8, 3, 3318-24.

Ayaz E, Yilmaz H, Ozbek H, Tas Z, Orunc O, 2007. The effect of Nigella sativa oil against Aspiculuris tetraptera and Hymenolepis nana in naturally infected mice. Saudi Med J, 28, 11, 1654-7.

Ayesh R, Mitchell SC, Zhang A, Smith RL, 1993. The fish odour syndrome: biochemical, familial, and clinical aspects. BMJ, 307, 6905, 655-7.

Badary OA, Nagi MN, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Sohaibani MO, al-Bekairi AM, 1997. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. Can J Physiol Pharmacol, 75, 12, 1356-61.

Banfalvi G, 2014. Apoptotic agents inducing genotoxicity-specific chromatin changes. Apoptosis, 19, 9, 1301-16.

Baytop T, 1984. Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün), İstanbul Üniversitesi, p.181-182,188

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H, 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 17, 3, 472-6.

Biber N, Toklu HZ, Solakoglu S, Gultomruk M, Hakan T, Berkman Z, Dulger FG, 2009. Cysteinyl-leukotriene receptor antagonist montelukast decreases blood-brain barrier permeability but does not prevent oedema formation in traumatic brain injury. Brain Inj, 23, 6, 577-84.

Borah A, Paul R, Choudhury S, Choudhury A, Bhuyan B, Das Talukdar A, Dutta Choudhury M, Mohanakumar KP, 2013. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. CNS Neurosci Ther, 19, 11, 847-53.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M, 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol, 186, 343-55.

Bouhlel A, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, Mannaï S, Corlu A, Ben Abdennebi H, 2017. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. Biomed Pharmacother, 94, 964-73.

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG, 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. Stroke, 40, 5, e331-9.

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD, 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. Stroke, 17, 4, 738-43.

Chen XJ, Zhang JG, Wu L, 2018. Plumbagin inhibits neuronal apoptosis, intimal hyperplasia and also suppresses TNF-α/NF-κB pathway induced inflammation and matrix metalloproteinase-2/9 expression in rat cerebral ischemia. Saudi J Biol Sci, 25, 6, 1033-9.

Cwalina-Ambroziak B, Wierzbowska J, Damszel M, Bowszys T, 2012. The effect of mineral fertilization on achenes yield and fungal communities isolated from the stems of milk thistle Silybum marianum (L.) Gaertner. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, 11.

Dasdelen D, Solmaz M, Menevse E, Mogulkoc R, Baltaci AK, Erdogan E, 2021. Increased apoptosis, tumor necrosis factor-alpha, and DNA damage attenuated by 3',4'-dihydroxyflavonol in rats with brain Ischemia-reperfusion. Indian J Pharmacol, 53, 1, 39-49.

Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G, 2005. Does autophagy contribute to cell death? Autophagy, 1, 2, 66-74.

Deng C, Li J, Li L, Sun F, Xie J, 2019. Effects of hypoxia ischemia on caspase-3 expression and neuronal apoptosis in the brain of neonatal mice. Exp Ther Med, 17, 6, 4517-21.

Deve Dikeni, Pixabay, Erişim Tarihi: 11. Ekim 2021, Erişim Adresi: https://pixabay.com/tr/photos/devedikeni-ortak-e%c5%9fek-dikeni-4381235/

Doğan G, İpek H, Baş Y, Doğan G, Kayır S, 2019. Experimental study on prophylactic effects of vardenafil in ischemia-reperfusion model with intestinal volvulus injury in rats. J Pediatr Surg, 54, 10, 2172-7.

Dong J, Zhang X, Wang S, Xu C, Gao M, Liu S, Li X, Cheng N, Han Y, Wang X, Han Y, 2020. Thymoquinone Prevents Dopaminergic Neurodegeneration by Attenuating Oxidative Stress Via the Nrf2/ARE Pathway. Front Pharmacol, 11, 615598.

Eklöf B, Siesjö BK, 1972. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. Acta Physiol Scand, 86, 4, 528-38.

el-Dakhakhny M, 1965. Studies on the Egyptian Nigella sativa L. IV. Some pharmacological properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. Arzneimittelforschung, 15, 10, 1227-9.

El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, Takewaki T, 2002. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. International immunopharmacology, 2, 11, 1603-11.

Ellison D, 2004. Neuropathology : a reference text of CNS pathology, Edinburgh ; New York, Mosby, p.17,172-183

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL, 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res, 25, 9-10, 1439-51.

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B, 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res, 28, 2, 351-4.

Erel O, 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 37, 4, 277-85.

Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yüksel M, Yeğen BC, Sener G, 2009. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. J Pineal Res, 46, 3, 324-32.

Erşahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yüksel M, Erzik C, Berkman MZ, Yeğen BC, Sener G, 2010. Alpha lipoic acid alleviates oxidative stress and preserves blood brain permeability in rats with subarachnoid hemorrhage. Neurochem Res, 35, 3, 418-28.

Fabres RB, Montes NL, Camboim YM, de Souza SK, Nicola F, Tassinari ID, Ribeiro MFM, Netto CA, de Fraga LS, 2020. Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. Cell Mol Neurobiol, 40, 8, 1417-28.

Fan C, Tian F, Zhao X, Sun Y, Yang X, Han H, Pu X, 2020. The Effect of Thymoquinone on the Characteristics of the Brain Extracellular Space in Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. Biol Pharm Bull, 43, 9, 1306-14.

Fan L, Zhou L, 2021. AG490 protects cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting the JAK2/3 signaling pathway. Brain Behav, 11, 1, e01911.

Fang SH, Wei EQ, Zhou Y, Wang ML, Zhang WP, Yu GL, Chu LS, Chen Z, 2006. Increased expression of cysteinyl leukotriene receptor-1 in the brain mediates neuronal damage and astrogliosis after focal cerebral ischemia in rats. Neuroscience, 140, 3, 969-79.

Fararh KM, Ibrahim AK, Elsonosy YA, 2010. Thymoquinone enhances the activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic rats. Res Vet Sci, 88, 3, 400-4.

Fennema D, Phillips IR, Shephard EA, 2016. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. Drug Metab Dispos, 44, 11, 1839-50.

Ferrari F, Gorini A, Hoyer S, Villa RF, 2018. Glutamate metabolism in cerebral mitochondria after ischemia and post-ischemic recovery during aging: relationships with brain energy metabolism. J Neurochem, 146, 4, 416-28.

Ferrer I, Vidal N, 2017. Neuropathology of cerebrovascular diseases. Handb Clin Neurol, 145, 79-114.

Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K, 1998. Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. Am J Gastroenterol, 93, 2, 139-43.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ, 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol, 182, 1, 41-9.

Fraschini F, Demartini G, Esposti D, 2002. Pharmacology of Silymarin. Clinical Drug Investigation, 22, 1, 51-65.

Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ, 1995. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. Stroke, 26, 4, 627-34; discussion 35.

Ghnenis AB, Czaikowski RE, Zhang ZJ, Bushman JS, 2018. Toluidine Blue Staining of Resin-Embedded Sections for Evaluation of Peripheral Nerve Morphology. J Vis Exp, 137.

Ghobadi Pour M, Mirazi N, Alaei H, Moradkhani S, Rajaei Z, Monsef Esfahani A, 2017. Effects of lactulose and silymarin on liver enzymes in cirrhotic rats. Can J Physiol Pharmacol, 95, 5, 522-9.

Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA, 1999. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L.). J Pharm Biomed Anal, 19, 5, 757-62.

Ginsberg MD, Busto R, 1989. Rodent models of cerebral ischemia. Stroke, 20, 12, 1627-42.

Gunduz ZB, Aktas F, Vatansev H, Solmaz M, Erdogan E, 2021. Effects of amantadine and topiramate on neuronal damage in rats with experimental cerebral ischemia-reperfusion. Adv Clin Exp Med.

Gupta S, Gupta YK, 2017. Combination of Zizyphus jujuba and silymarin showed better neuroprotective effect as compared to single agent in MCAo-induced focal cerebral ischemia in rats. J Ethnopharmacol, 197, 118-27.

Gupta YK, Briyal S, 2004. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol, 48, 4, 379-94.

Hausmann R, Riess R, Fieguth A, Betz P, 2000. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. Int J Legal Med, 113, 2, 70-5.

Heaney LM, Jones DJ, Mbasu RJ, Ng LL, Suzuki T, 2016. High mass accuracy assay for trimethylamine N-oxide using stable-isotope dilution with liquid chromatography coupled to orthogonal acceleration time of flight mass spectrometry with multiple reaction monitoring. Anal Bioanal Chem, 408, 3, 797-804.

Hirayama K, Oshima H, Yamashita A, Sakatani K, Yoshino A, Katayama Y, 2016. Neuroprotective effects of silymarin on ischemia-induced delayed neuronal cell death in rat hippocampus. Brain Res, 1646, 297-303.

Horst GJ, Korf J, SpringerLink (Online service), (1997). Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia. Contemporary Neuroscience. Totowa, NJ, Humana Press : Imprint: Humana Press,: X, 305 p.265-295

Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl MN, Sadeghnia HR, Ziaee T, 2007. Effect of thymoquinone and Nigella sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. Phytomedicine, 14, 9, 621-7.

Hou B, Liu R, Wu Y, Huang S, 2020. Astragaloside IV Reduces Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Blood-Brain Barrier Permeability in Rats by Inhibiting ER Stress-Mediated Apoptosis. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 9087873.

Hou YC, Liou KT, Chern CM, Wang YH, Liao JF, Chang S, Chou YH, Shen YC, 2010. Preventive effect of silymarin in cerebral ischemia-reperfusion-induced brain injury in rats possibly through impairing NF-κB and STAT-1 activation. Phytomedicine, 17, 12, 963-73.

Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y, 2006. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 31, 11790-5.

Isik AF, Kati I, Bayram I, Ozbek H, 2005. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg, 28, 2, 301-5.

Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA, 2002. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. Am J Med, 113, 6, 506-15.

Jian Liu K, Rosenberg GA, 2005. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. Free Radic Biol Med, 39, 1, 71-80.

Johnson VL, Ko SC, Holmstrom TH, Eriksson JE, Chow SC, 2000. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. J Cell Sci, 113 (Pt 17), 2941-53.

Kahraman, A. , Serteser, M. & Koken, T, 2002. Flavonoidler . Kocatepe Tıp Dergisi , 3 (1) , . Retrieved from https://dergipark.org.tr/tr/pub/kocatepetip/issue/17433/182601 doi:10.18229/ktd.98138

Karabag H, Koçarslan S, 2019. Comparison of the effects of thymoquinone and silymarin on the brain of rats having ischemia-reperfusion in the lower extremities. Ann Ital Chir, 8.

Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima G, Joó F, Mies G, Nowak TS, Jr., Saito N, Lohr JM, Klatzo I, 1992. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. J Cereb Blood Flow Metab, 12, 2, 238-49.

Kazazis CE, Evangelopoulos AA, Kollas A, Vallianou NG, 2014. The therapeutic potential of milk thistle in diabetes. Rev Diabet Stud, 11, 2, 167-74.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26, 4, 239-57.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH, 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, 84, 5, 1415-20.

Kosina P, Maurel P, Ulrichova J, Dvorak Z, 2005. Effect of silybin and its glycosides on the expression of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in primary cultures of human hepatocytes. J Biochem Mol Toxicol, 19, 3, 149-53.

Kren V, Walterova D, 2005. Silybin and silymarin--new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 149, 1, 29-41.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA, 2018. Robbins basic pathology, p.31-54

Kumas M, Altintas O, Karatas E, Kocyigit A, 2017. Protective Effect of Ischemic Preconditioning on Myocardium Against Remote Tissue Injury Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. Arq Bras Cardiol, 109, 6, 516-26.

Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA, 1990. Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. J Cereb Blood Flow Metab, 10, 4, 550-6.

Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y, 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. J Immunol, 171, 9, 4672-9.

Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, Maronpot RR, Trump BF, 1999. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. Toxicol Pathol, 27, 4, 484-90.

Li C, Jackson RM, 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol, 282, 2, C227-41.

Liu CH, Jassey A, Hsu HY, Lin LT, 2019. Antiviral Activities of Silymarin and Derivatives. Molecules, 24, 8.

Liu D, Gu Y, Wang W, Chen W, 2020. Astragalin alleviates ischemia/reperfusion-induced brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress. Mol Med Rep, 22, 5, 4070-8.

Liu J, Zhang T, Wang Y, Si C, Wang X, Wang RT, Lv Z, 2020. Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota. Aging (Albany NY), 12, 4, 3791-806.

Liu Y, Huang Y, 2015. Abstract 18781: Elevated Trimethylamine-n-oxide Levels May Contributes to Progression of Cerebral Small Vessel Diseases in Poststroke Patients via Blood Brain Barrier Disruption. Circulation.

Liu Z, Chopp M, 2016. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. Prog Neurobiol, 144, 103-20.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell, 104, 4, 487-501.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 20, 1, 84-91.

Lopez MS, Vemuganti R, 2018. Modeling Transient Focal Ischemic Stroke in Rodents by Intraluminal Filament Method of Middle Cerebral Artery Occlusion. In: Traumatic and Ischemic Injury: Methods and Protocols. Eds: Tharakan B. New York, NY: Springer New York, p. 101-13.

Macfarlane PS, Reid R, Callander R, Govan ADT, 2000. Pathology illustrated. Edinburgh: Churchill Livingstone, p2-32

Majno G, Joris I, 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995 Jan;146(1):3-15. PMID: 7856735; PMCID: PMC1870771.

Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, 2001. Effects of volatile oil constituents of Nigella sativa on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 110, 3-4, 239-51.

Mao X, Ji C, Sun C, Cao D, Ma P, Ji Z, Cao F, Min D, Li S, Cai J, Cao Y, 2012. Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis. Neurochemistry International, 60, 1, 39-46.

Meydan S, Esrefoglu M, Selek S, Akbas Tosunoglu E, Ozturk O, Kurbetli N, Bayındır N, Bulut H, Meral I, 2019. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity. Biotech Histochem, 94, 4, 277-82.

Middeldorp J, Hol EM, 2011. GFAP in health and disease. Prog Neurobiol, 93, 3, 421-43.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A, 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci (Lond), 84, 4, 407-12.

Mirarab E, Hojati V, Vaezi G, Shiravi A, Khaksari M, 2019. Obestatin inhibits apoptosis and astrogliosis of hippocampal neurons following global cerebral ischemia reperfusion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. Iran J Basic Med Sci, 22, 6, 617-22.

Moghaddam AH, Mokhtari Sangdehi SR, Ranjbar M, Hasantabar V, 2020. Preventive effect of silymarin-loaded chitosan nanoparticles against global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Eur J Pharmacol, 877, 173066.

Mohamed AM, Metwally NM, Mahmoud SS, 2005. Sativa seeds against Schistosoma mansoni different stages. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100, 2, 205-11.

Mokhtari Sangdehi SR, Hajizadeh Moghaddam A, Ranjbar M, 2021. Anti-apoptotic effect of silymarin-loaded chitosan nanoparticles on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following cerebral ischemia/reperfusion injury. Int J Neurosci, 1-8.

Moon YJ, Wang X, Morris ME, 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro, 20, 2, 187-210.

Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G, 1993. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 18, 3, 289-97.

Muley MM, Thakare VN, Patil RR, Bafna PA, Naik SR, 2013. Amelioration of cognitive, motor and endogenous defense functions with silymarin, piracetam and protocatechuic acid in the cerebral global ischemic rat model. Life Sci, 93, 1, 51-7.

Muley MM, Thakare VN, Patil RR, Kshirsagar AD, Naik SR, 2012. Silymarin improves the behavioural, biochemical and histoarchitecture alterations in focal ischemic rats: a comparative evaluation with piracetam and protocatachuic acid. Pharmacol Biochem Behav, 102, 2, 286-93.

Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Bekairi AM, 1999. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. Biochem Mol Biol Int, 47, 1, 153-9.

Nawashiro H, Messing A, Azzam N, Brenner M, 1998. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. Neuroreport, 9, 8, 1691-6.

Neha, Jaggi AS, Singh N, 2016. Silymarin and Its Role in Chronic Diseases. Adv Exp Med Biol, 929, 25-44.

Nencini C, Giorgi G, Micheli L, 2007. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine, 14, 2-3, 129-35.

Obeng E, 2021. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. Braz J Biol, 81, 4, 1133-43.

Oruc S, Gönül Y, Tunay K, Oruc OA, Bozkurt MF, Karavelioğlu E, Bağcıoğlu E, Coşkun KS, Celik S, 2016. The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats. Life Sci, 154, 79-86.

Özbek H, Öztürk M, Öztürk A, Ceylan E, Yener Z, 2004. Determination of Lethal Doses of Volatile and Fixed Oils of Several Plants. Eastern J Med, 9, 1, 4-6.

Özdemir A, Yaka E, Tolun R, Giray S, Güngör L, Kutluk K, Uzuner N, 2015. Specific Management of Ischemic Stroke: Guidelines Of Turkish Society Of Cerebrovascular Diseases – 2015. Turkish Journal of Cerebrovascular Diseases, 21, 93-8.

Palmieri B, Sblendorio V, 2007. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 11, 5, 309-42.

Poellmann MJ, Bu J, Hong S, 2018. Would antioxidant-loaded nanoparticles present an effective treatment for ischemic stroke? Nanomedicine (Lond), 13, 18, 2327-40.

Porth C, Gaspard KJ, Porth C, ebrary I, 2015. Essentials of pathophysiology : concepts of altered health states Philadelphia, PA : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, p.99-109

Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA, 2015. Acute Stroke Intervention: A Systematic Review. JAMA, 313, 14, 1451-62.

Pradhan SC, Girish C, 2006. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Res, 124, 5, 491-504.

Pulsinelli WA, Buchan AM, 1988. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. Stroke, 19, 7, 913-4.

Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A, 2009. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi J Kidney Dis Transpl, 20, 5, 741-52.

Rainaldi G, Romano R, Indovina P, Ferrante A, Motta A, Indovina PL, Santini MT, 2008. Metabolomics using 1H-NMR of apoptosis and Necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. Radiat Res, 169, 2, 170-80.

Rathore P, Arora I, Rastogi S, Akhtar M, Singh S, Samim M, 2020. Collagen Nanoparticle-Mediated Brain Silymarin Delivery: An Approach for Treating Cerebral Ischemia and Reperfusion-Induced Brain Injury. Front Neurosci, 14, 538404.

Raza SS, Khan MM, Ashafaq M, Ahmad A, Khuwaja G, Khan A, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F, 2011. Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: a behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. J Neurol Sci, 309, 1-2, 45-54.

Rexidamu M, Li H, Jin H, Huang J, 2019. Serum levels of Trimethylamine-N-oxide in patients with ischemic stroke. Biosci Rep, 39, 6.

Ross DT, Duhaime AC, 1989. Degeneration of neurons in the thalamic reticular nucleus following transient ischemia due to raised intracranial pressure: excitotoxic degeneration mediated via non-NMDA receptors? Brain Res, 501, 1, 129-43.

Rui YC, Zhang DZ, Sun DX, Zeng GQ, 1990. [Effects of silybin on production of oxygen free radical, lipoperoxide and leukotrienes in brain following ischemia and reperfusion]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 11, 5, 418-21.

Salem ML, 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol, 5, 13-14, 1749-70.

Salmani JM, Asghar S, Lv H, Zhou J, 2014. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light. Molecules, 19, 5, 5925-39.

Shuid AN, Mohamed N, Mohamed IN, Othman F, Suhaimi F, Mohd Ramli ES, Muhammad N, Soelaiman IN, 2012. Nigella sativa: A Potential Antiosteoporotic Agent. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 696230.

Silachev DN, Plotnikov EY, Zorova LD, Pevzner IB, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Gulyaev MV, Pirogov YA, Skulachev VP, Zorov DB, 2015. Neuroprotective Effects of Mitochondria-Targeted Plastoquinone and Thymoquinone in a Rat Model of Brain Ischemia/Reperfusion Injury. Molecules, 20, 8, 14487-503.

Small DL, Buchan AM, 2000. Animal models. Br Med Bull, 56, 2, 307-17.

Smith JL, Wishnok JS, Deen WM, 1994. Metabolism and excretion of methylamines in rats. Toxicol Appl Pharmacol, 125, 2, 296-308.

Sobotta J, Paulsen F, Waschke J, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, 2013. Sobotta atlas of human anatomy, München, Elsevier/Urban & Fischer, c.1 p.258-264

Sommer CJ, 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. Acta Neuropathol, 133, 2, 245-61.

Standring S, 2016. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice, Philadelphia, Elsevier Limited, p.280-291

Stavric B, 1994. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. Clin Biochem, 27, 4, 245-8.

Stavric B, 1994. Role of chemopreventers in human diet. Clin Biochem, 27, 5, 319-32.

Subramaniam S, Fletcher C, 2018. Trimethylamine N-oxide: breathe new life. Br J Pharmacol, 175, 8, 1344-53.

Suzuki R, Watanabe J, Arata S, Funahashi H, Kikuyama S, Shioda S, 2003. A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. Neurosci Res, 47, 4, 451-4.

Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB, 2008. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. Hum Mutat, 29, 3, 351-60.

Tajiri N, Dailey T, Metcalf C, Mosley YI, Lau T, Staples M, van Loveren H, Kim SU, Yamashima T, Yasuhara T, Date I, Kaneko Y, Borlongan CV, 2013. In vivo animal stroke models: a rationale for rodent and non-human primate models. Transl Stroke Res, 4, 3, 308-21.

Taleb A, Ahmad KA, Ihsan AU, Qu J, Lin N, Hezam K, Koju N, Hui L, Qilong D, 2018. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. Biomed Pharmacother, 102, 689-98.

T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Araştırma, Geliştirme ve Sağlık Teknolojisi Değerlendirme Dairesi Başkanlığı Akut İskemik İnme Tanı ve Tedavi Rehberi (Versiyon 1.0) Ankara,2020 T.C. Sağlık Bakanlığı Yayın Numarası: 1152 ISBN: 978-975-590-745-1 Erişim tarihi:11.Ekim 2021, Erişim adresi: https://shgm.saglik.gov.tr/TR-64370/akut-iskemik-inme-tani-ve-tedavi-rehberi-yayinlanmistir.html

Tian F, Liu R, Fan C, Sun Y, Huang X, Nie Z, Zhao X, Pu X, 2020. Effects of Thymoquinone on Small-Molecule Metabolites in a Rat Model of Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Assessed using MALDI-MSI. Metabolites, 10, 1.

Toklu HZ, Uysal MK, Kabasakal L, Sirvanci S, Ercan F, Kaya M, 2009. The Effects of Riluzole on Neurological, Brain Biochemical, and Histological Changes in Early and Late Term of Sepsis in Rats. Journal of Surgical Research, 152, 2, 238-48.

Toklu HZ, Yang Z, Ersahin M, Wang KKW, 2019. Neurological Exam in Rats Following Stroke and Traumatic Brain Injury. Methods Mol Biol, 2011, 371-81.

Toklu HZ, Yang Z, Oktay S, Sakarya Y, Kirichenko N, Matheny MK, Muller-Delp J, Strang K, Scarpace PJ, Wang KKW, Tümer N, 2018. Overpressure blast injury-induced oxidative stress and neuroinflammation response in rat frontal cortex and cerebellum. Behav Brain Res, 340, 14-22.

Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC, 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol Pathol, 25, 1, 82-8.

Türkdoğan MK, Ozbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E, 2003. The role of Urtica dioica and Nigella sativa in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Phytother Res, 17, 8, 942-6.

Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R, 2015. TMAO: A small molecule of great expectations. Nutrition, 31, 11-12, 1317-23.

Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MO, 2012. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. BMC Neurosci, 13, 11.

Urry LA, 2017. Campbell biology / Lisa A. Urry, Noel Meyers, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Jane B. Reece. National edeposit: Available onsite at national, state and territory libraries, Melbourne, VIC, Pearson Australia, p.

Valenzuela A, Garrido A, 1994. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol Res, 27, 2, 105-12.

Villalobos AR, Renfro JL, 2007. Trimethylamine oxide suppresses stress-induced alteration of organic anion transport in choroid plexus. J Exp Biol, 210, Pt 3, 541-52.

Wang M, Li YJ, Ding Y, Zhang HN, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo YY, Liu SB, Zhao MG, Wu YM, 2016. Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. Mol Neurobiol, 53, 2, 932-43.

Wang W, Redecker C, Yu ZY, Xie MJ, Tian DS, Zhang L, Bu BT, Witte OW, 2008. Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclin-dependent kinase inhibition. J Clin Neurosci, 15, 3, 278-85.

Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL, 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature, 472, 7341, 57-63.

Watanabe A, Sasaki T, Yukami T, Kanki H, Sakaguchi M, Takemori H, Kitagawa K, Mochizuki H, 2016. Serine racemase inhibition induces nitric oxide-mediated neurovascular protection during cerebral ischemia. Neuroscience, 339, 139-49.

WHO The top 10 causes of death, 2020. Erişim tarihi:11.Ekim.2021, Erişim adresi: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death

Wu R, Feng J, Yang Y, Dai C, Lu A, Li J, Liao Y, Xiang M, Huang Q, Wang D, Du X-B, 2017. Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. PLOS ONE, 12, 1, e0170003.

Xie Y, Zacharias E, Hoff P, Tegtmeier F, 1995. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. J Cereb Blood Flow Metab, 15, 4, 587-94.

Xu R, Wang Q, 2016. Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. BMC Systems Biology, 10, 3, 63.

Young IS, 2001. Measurement of total antioxidant capacity. J Clin Pathol, 54, 5, 339-342

Zeisel SH, 1981. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. Annu Rev Nutr, 1, 95-121.

Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK, 1983. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. J Pharmacol Exp Ther, 225, 2, 320-4.

Zhang T, Andrukhov O, Haririan H, Müller-Kern M, Liu S, Liu Z, Rausch-Fan X, 2016. Total Antioxidant Capacity and Total Oxidant Status in Saliva of Periodontitis Patients in Relation to Bacterial Load. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5, 97.

Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, Sarkar FH, Hadi SM, 2013. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. Cell Death & Disease, 4, 6, e660-e.

EK-B: Turnitin Raporu

RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE SİLİMARİN VE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Yazar Merve Solmaz

Gönderim Tarihi: 01-Ara-2021 12:32PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1717279556
Dosya adı: VE_TI_MOKI_NONUN_KORUYUCU_ETKI_LERI_NI_N_KARS_ILAS_TIRILMASI.pdf (35.47M)
Kelime sayısı: 22736
Karakter sayısı: 134651

RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE SİLİMARİN VE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1
2	earsiv.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	acikders.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	arapdili.emsile.com İnternet Kaynağı	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	issuu.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Istanbul Medipol Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

Submitted to Recep Tayyip Erdogan University

9	Öğrenci Ödevi	<%1
10	farsdili.emsile.com İnternet Kaynağı	<%1
11	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
12	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
13	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
14	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
15	repozitorij.mefst.unist.hr İnternet Kaynağı	<%1
16	doaj.org İnternet Kaynağı	<%1
17	tr.ovalengineering.com İnternet Kaynağı	<%1
18	www.yildontanju.com İnternet Kaynağı	<%1
19	"Poster Communications", Acta Physiologica, 2019 Yayın	<%1
20	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	

		<%1
21	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
22	jeb.biologists.org İnternet Kaynağı	<%1
23	www.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
24	www.vvc.gov.lv İnternet Kaynağı	<%1
25	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<%1
26	thritajournal.com İnternet Kaynağı	<%1
27	www.saujs.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
28	E. Ch. Wolters, H. J. Groenewegen. "Neurologie", Springer Nature, 2004 Yayın	<%1
29	Esrar ÇELİK, Betül AKA, Başak YAZKAN, Gözde ÖZTÜRK. "Efficacy and Colour Stability of Two Different at-Home Bleaching Systems: One-year Randomized Controlled Clinical Trial",	<%1

	Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences, 2018 Yayın	
30	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<%1
31	search.bvsalud.org İnternet Kaynağı	<%1
32	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
33	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
34	ZEYTİN, Kayhan, ÇİLOĞLU, Nesibe Sinem, ATEŞ, Filiz, AKER VARDAR, Fugen and ERCAN, Feriha. "The effects of resveratrol on tendon healing of diabetic rats", Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği/Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology, 2014. Yayın	<%1
35	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1
36	Gülay BÖREKÇİ, Sevim KARAKAŞ ÇELİK, Özlem KANDEMİR, Nurcan ARAS, Serap YALIN. "Investigation of IL-1 Beta, IL-1 Receptor Antagonist and IL-8 Gene Polymorphisms in Patients with Chronic Hepatitis B and C", Mikrobiyoloji Bulteni, 2014	<%1

	Yayın	
37	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
38	www.fizyoterapirehabilitasyon.org İnternet Kaynağı	<%1
39	www.klimik.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
40	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
41	ÖZDAMAR, Mustafa Yaşar, YURTÇU, Müslim, TOY, Hatice, AKÖZ, Mehmet and GÜNEL, Engin. "Renal iskemi-reperfüzyon hasarında üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresinin etkisi", TUBITAK, 2010. Yayın	<%1
42	KALKAN, Yıldıray, TÜMKAYA, Levent, BOSTAN, Habib, TOMAK, Yakup, ALTUNER, Durdu, BAŞ, Orhan, ZORBA, Orhan Ünal and UZUN, Hakkı. "Yetişkin sıçanlarda testis hücreleri ve kalsinörin ımmunopozitifliği üzerine ketaminin etkileri: Bir ımmunohistokimyasal ve histopatolojik çalışma", TUBITAK, 2012. Yayın	<%1
43	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
44	arsiv.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	

		<%1
45	vfdergi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
46	www.erdis.org İnternet Kaynağı	<%1
47	www.hasekidergisi.com İnternet Kaynağı	<%1
48	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
49	1d89097f-9d02-4a53-bbe8-961b97c7793d.filesusr.com İnternet Kaynağı	<%1
50	KATAR, Duran, YAMAN, Hümeyra, SUBASI, İ□lhan and ARSLAN, Yusuf. "Meryemana dikeni (Silybum marianum (L.) Gaertn.) bitkisi tohumlarına farklı dozlarda gama ısını uygulamasıyla elde edilen M1 bitkilerinin fidelerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2013. Yayın	<%1
51	PARK, Young Hoon, LİM, Joo Han, Yİ, Hyeon Gyu, LEE, Moon Hee and KİM, Chul Soo. "BK Virus-Hemorrhagic Cystitis Following Allogeneic Stem Cell Transplantation: Clinical	<%1

	Characteristics and Utility of Leflunomide Treatment", Türk Hematoloji Derneği, 2016. Yayın	
52	acikerisim.akdeniz.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
53	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
54	openaccess.maltepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
55	www.drozberk.com İnternet Kaynağı	<%1
56	www.journals.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
57	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<%1
58	www.turkjbiochem.com İnternet Kaynağı	<%1
59	"Abstracts of the 47th Annual Meeting of the EASD, Lisbon 2011", Diabetologia, 2011 Yayın	<%1
60	DEVECİ, Hacı Ahmet, KARAPEHLİVAN, Mahmut, KAYA3, İnan, KÜKÜRT, Abdulsamed and ALPAY, Merve. "Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester□in koruyucu etkisi", Ankara Üniversitesi, 2015.	<%1

Yayın

61	Pelin GÜZELSOY, Sevtap AYDIN, Nurşen BAŞARAN. "Potential Effects of Thymoquinone the Active Constituent of Black Seed (Nigella Sativa L.) on Human Health", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2018 Yayın	<%1
62	NİZAMLIOĞLU, Nizam Mustafa and AKIN, Nihat. "Farklı Yoğurt ve Yem Tüketiminin Ratlarda Serum Kolesterol Seviyesine ", Sidas Medya Limited Şirketi, 2017. Yayın	<%1

Alıntıları çıkart Kapat
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde
Eşleşmeleri çıkar Kapat