



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

PAR-2 İNHİBİSYONUNUN SIÇANLARDA CERRAHİ BEYİN  
YARALANMASINA BAĞLI KAN BEYİN BARIYERİ HASARINI ÖNLEMEDE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Yazan BANİSHAMSAH

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

PAR-2 İNHİBİSYONUNUN SIÇANLARDA CERRAHİ BEYİN  
YARALANMASINA BAĞLI KAN BEYİN BARIYERİ HASARINI ÖNLEMEDE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Yazan BANİSHAMSAH

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan KOCAELİ

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023

## İÇİNDEKİLER

Özet .....	ii
Summary .....	iv
Giriş .....	1
Gereç ve Yöntem .....	4
A: Sıçanda Cerrahi Beyin Hasarı Modeli .....	4
A.1: Deney Protokolü .....	6
A.2: İntranazal İlaç Uygulaması .....	10
A.3: Beyin Su İçeriğinin Değerlendirilmesi .....	10
B: Nörolojik Sonuçların Değerlendirilmesi .....	10
B.1: mGS .....	10
B.2: Denge Kalası Testi (Beam balance test) .....	11
B.3: Ayak Hatası Testi (Foot fault test) .....	12
C: İmmünohistokimyasal İnceleme .....	12
C.1: Western Blot Yöntemi .....	12
D: İstatistiksel Analizler .....	13
Bulgular .....	14
Tartışma ve Sonuç .....	24
Kaynaklar .....	29
EK-1: Kısaltmalar .....	32
EK-2: Şekil, Resim, Tablo ve Grafik Açıklamaları .....	33
Teşekkür .....	36
Özgeçmiş .....	37

## ÖZET

Beyin hasarına ilk yanıt veren hücreler mast hücreleridir. Triptaz santral sinir sisteminde eksprese edilen ve proteaz aktive edici reseptör (PAR) ailesinin bir üyesi olan PAR-2'nin endojen ligandıdır. Güncel literatür, çeşitli beyin yaralanmaları sonrasında PAR-2'nin kan beyin bariyeri (KBB) hasarında katkısı olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmada PAR-2 inhibisyonunun sıçanlarda cerrahi beyin hasarına (CBH) bağlı KBB hasarını önlemede etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 92 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan Sham ve CBH gruplarına ayrıldı. Denekler dört ana deney için [seyir çalışması (n=4/grup), 24-saat son durum (n=6/grup), 72-saat son durum (n=4/grup), mekanizma çalışması (n=6/grup)] rastgele 4 gruba ayrıldı [Sham, CBH+ Serum Fizyolojik (SF), CBH+FSLLRY-NH<sub>2</sub>, CBH+FSLLRY-NH<sub>2</sub>+AC55541]. CBH sonrası beyin su içeriği (BSİ) ve nörodavranış testleri değerlendirildi. Western blot (WB) yöntemi kullanılarak triptaz, PAR-2, albumin, okludin ve klaudin-5 proteinlerinin seviyelerine bakıldı.

CBH sonrası BSİ'de artış, nörodavranış testlerde bozulma, endojen triptaz ve PAR-2 ekspresyonunda artış saptandı. CBH sonrası PAR-2 inhibisyonu (FSLLRY-NH<sub>2</sub>) uygulaması, beyin ödeminde azalma ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ile sonuçlandı. Ayrıca WB yöntemi ile PAR-2 ve albumin seviyesindeki azalma ile okludin ve klaudin-5 seviyesindeki artış gösterilerek sonuçlar doğrulandı.

CBH sonrası görülen KBB hasarı ve sonuçta gelişen beyin ödemi nörolojik disfonksiyona yol açmaktadır. PAR-2 inhibisyonu, CBH sonrası beyin ödeminde azalma ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ile ilişkilidir. Ayrıca CBH'yi takiben PAR-2 aktivasyonu (AC55541), PAR-2 inhibisyonu ile sağlanan nöroprotektif etkiyi geri döndürmektedir. Bu da CBH sonrası mast hücre triptazına bağlı KBB hasarının en azından kısmen PAR-2 aracılığıyla

etkilendiğini desteklemektedir. CBH sonrası PAR-2 inhibisyonu KBB hasarını azaltmada yeni bir teröpatik hedef olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Cerrahi beyin hasarı, kan beyin bariyeri, mast hücre, proteaz aktive edici reseptör-2, triptaz.

## SUMMARY

### **Investigation of the Effect Of PAR-2 Inhibition in Prevention of Blood Brain Barrier Damage Related to Surgical Brain Injury in Rats**

The first cells that respond to brain injury are mast cells. Tryptase is an endogenous ligand of protease-activated receptor-2 (PAR-2) which is a member of the PAR family that expressed in the central nervous system. Current literature, supports the PAR-2 contribution of PAR-2 to blood brain barrier (BBB) damage after brain injuries. This study aimed to investigate the effect of PAR-2 inhibition in preventing BBB damage after surgical brain injury (SBI) in rats.

In our study 92 female Sprague Dawley rats were divided into sham and SBI groups. Animals were divided into 4 main experiments [time course (n=4/grup), 24-hour (n=6/grup), 72-hour (n=4/grup), mechanism (n=6/grup)] to 4 groups (Sham, SBI+salin, SBI+FSLLRY-NH<sub>2</sub>, SBI+FSLLRY-NH<sub>2</sub>+AC55541). Following SBI brain water content (BWC) and neurological status were evaluated. Levels of tryptase, PAR-2, albumin, occludin and claudin-5 proteins were measured using western blot (WB) method.

An increase in BWC, deterioration in neurobehavioral tests, and increase in endogenous PAR-2 expression were detected after SBI. Administration of PAR-2 inhibition (FSLLRY-NH<sub>2</sub>) following SBI, reduced brain edema and improved neurofunction. Additionally, Resultes were confirmed with WB method, detecting a reduce in albumin and PAR-2 after SBI, and an increase in occludin and claudin-5.

BBB injury and resulting brain edema after SBI lead to the neurodysfunction. Inhibition of PAR-2 is associated with reduction brain edema and improvement in neurofunction. Additionally, PAR-2 activation (AC55541) following SBI reverses neuroprotective effect provided by PAR-2 inhibition. This supports mast cell tryptase-induced BBB damage after SBI is

partially mediated by PAR-2. PAR-2 inhibition after SBI may be a new therapeutic target in reducing BBB injury.

**Key words:** Surgical brain injury, blood brain barrier, mast cell, protease-activated receptor-2, tryptase.

## GİRİŞ

Mikroşirürjikal teknikler ve teknolojik son gelişmelere rağmen cerrahi işlemler sırasında yaşanan aksilikler ve komşu nöral dokunun yaralanma ihtimali beyin cerrahları için zorluk teşkil etmektedir. Beyin cerrahisindeki operasyonların büyük çoğunluğunda kortikal insizyonlar, aspirasyon, beyin retraksiyon sistemleri, elektrokoagülasyon gibi tekniklerin kullanılması ile meydana gelen beyin hasarı sonucu ödem gelişimi gibi komplikasyonların görülmesi kaçınılmazdır. Kan beyin bariyeri'nin (KBB) bozulmasını takiben gelişen serebral ödem ve buna bağlı nörolojik disfonksiyonlar başlıca nöroşirürjikal komplikasyonlar arasındadır (1, 2). Serebral ödeme yönelik tedavilerde uzun yıllardır bir ilerleme kaydedilememiştir.

Kraniyal cerrahi sırasında perioperatif nöral dokunun korunması için nöroprotektif stratejiler, son zamanlarda pek çok deneysel araştırmancının konusu olmuştur. Bu araştırmalar cerrahi beyin hasarı (CBH) teriminin önemsenmesine yol açmıştır. Klinik olarak CBH, altta yatan beyin patolojisinden kolayca ayırt edilemez. Bu durum CBH'yi bağımsız bir sonuç olarak incelemeyi zorlaştırır. Bununla birlikte, CBH'nin beyin fizyolojisi ve nörolojik sonuç üzerindeki etkisini ölçmek için hayvan modelleri geliştirilmiştir. Frontal lob CBH sıçan modeli hem kortikal hem de parankimal hasara neden olarak cerrahinin neden olduğu beyin hasarını simüle etmeye ve beyinde nöroşirürjikal girişimler sonrası görülen postoperatif değişiklikleri incelemeye yardımcı olmaktadır (3, 4).

Beyin mast hücreleri, beyin hasarına ilk yanıt veren hücrelerdir ve nöroinflamasyona yanıtın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (5). Artmış nötrofil aktivasyonu, inflamatuvar sitokin seviyelerindeki artış, hücre ölümü ve KBB'nin bozulması ile karakterize CBH modelinde kortikotomiye çevreleyen güçlü bir inflamatuvar reaksiyon mevcuttur (3, 6). Deneysel ortamda CBH'ye bağlı nöroinflamasyon; beyin dokusunun rezeksiyonu esnasında mikrogial aktivasyon, periferik immün hücre infiltrasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin artması ile beyin ödeme katkıda bulunmasıyla karakterizedir.

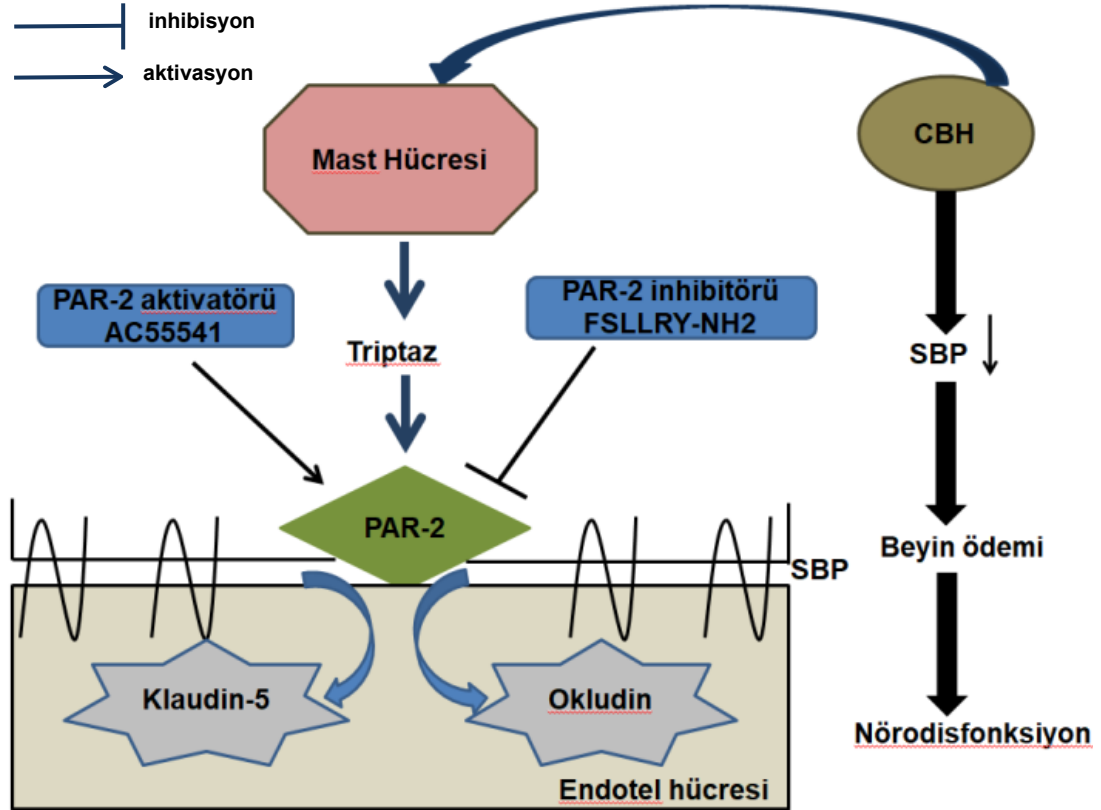


Nöroenflamasyonu hedef alan terapötik stratejiler, beyinde cerrahi işlemler uygulanan hastalarda postoperatif nörolojik defisitleri en aza indirmektedir (7).

Proteaz aktive edici reseptör-2 (PAR-2) santral sinir sisteminde (SSS) yaygın olarak eksprese edilen PAR reseptör ailesinin bir üyesidir. PAR-2, mast hücre triptazının endojen reseptörüdür ve ayrıca beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde bol miktarda eksprese edilmekte, çoğunlukla da mast hücreleri aktivasyonuna bağlı aktive olmaktadır (8). Daha önceki çalışmalar, deneysel beyin hasarı modellerinde KBB'deki bozulmaya bağlı beyin mast hücrelerinden salgılanan ana sekretuar protein olan triptazın proinflamatuvar sitokin salınımına yol açtığını, bunu da PAR-2 aracılığı ile mikroglia ve astrosit aktivasyonu yaparak gerçekleştirdiğini göstermiştir (9-11). PAR-2'nin SSS üzerindeki fizyolojik rolü tam olarak bilinmese de aktivasyonunun hem nöronlarda hem de astrositlerde hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyelerini arttırdığı ve nitrik oksit salınımını tetiklediği gösterilmiştir (12). Bunun aksine bazı çalışmalar, PAR-2'nin sinaptik etkiyi kaldırarak, astrositleri aktive ederek, gliotransmitter salarak ve MAP kinaz yollarını inhibe ederek nöroproteksiyona katkıda bulunduğunu desteklemektedir (13, 14). Bu nedenle, PAR-2'nin beyin patolojilerinin tedavisi için yeni bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür (12-14).

Çalışmamız, literatürde CBH sonrası PAR-2 ilişkili KBB hasarını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmada PAR-2 inhibisyonunun sıçanlarda cerrahi beyin yaralanmasına bağlı KBB hasarını önlemede etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda sıçanlarda CBH oluşturulması, oluşturulan sıçan gruplarında etkin dozlarda intranazal (i.n.) olarak FSLLRY-NH<sub>2</sub> (PAR-2 inhibitörü) ve AC55541 (PAR-2 aktivatörü) uygulaması ile beyin su içeriği (BSİ), nörolojik son durum ve sağ frontal cerrahi alan (SFCA) çevresi örneklerinde western blot (WB) yöntemi kullanılarak yolak proteinlerinin ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmaktadır.

Yukarıdaki bilgilere dayanarak, sıçanlarda PAR-2 inhibisyonunun CBH sonrası KBB hasarını önlemede etkin olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışma için önerilen mekanizma şekil-1'de gösterilmiştir.



**Şekil-1:** Bu çalışmada öne sürülen hipotezin şematik resmi. CBH takiben aktive olan mast hücrelerinden salınan triptaz PAR-2 aktivasyonuna sebep olur. CBH sonrası SBP ekspresyonundaki azalmaya bağlı beyin ödemi sonuç olarak nörolojik disfonksiyon gelişmektedir. Bu çalışmada tedavi amacı ile PAR-2 inhibitörü (FSLRY-NH2) kullanılırken, hipotезде önerilen mekanizmanın teyidi için PAR-2 aktivatörü (AC55541) kullanılmıştır. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **SBP:** Sıkı Bağlantı Proteinleri.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 14.09.2021 tarih ve 2021-11/10 numaralı kararıyla onaylandı.

Çalışmamız, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji anabilim dalı laboratuvarında yapıldı. Çalışmada 280-380 gr ağırlığında, toplam 143 adet, Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. 4 ana deney için hayvanlar 2 ana gruba ayrıldı:

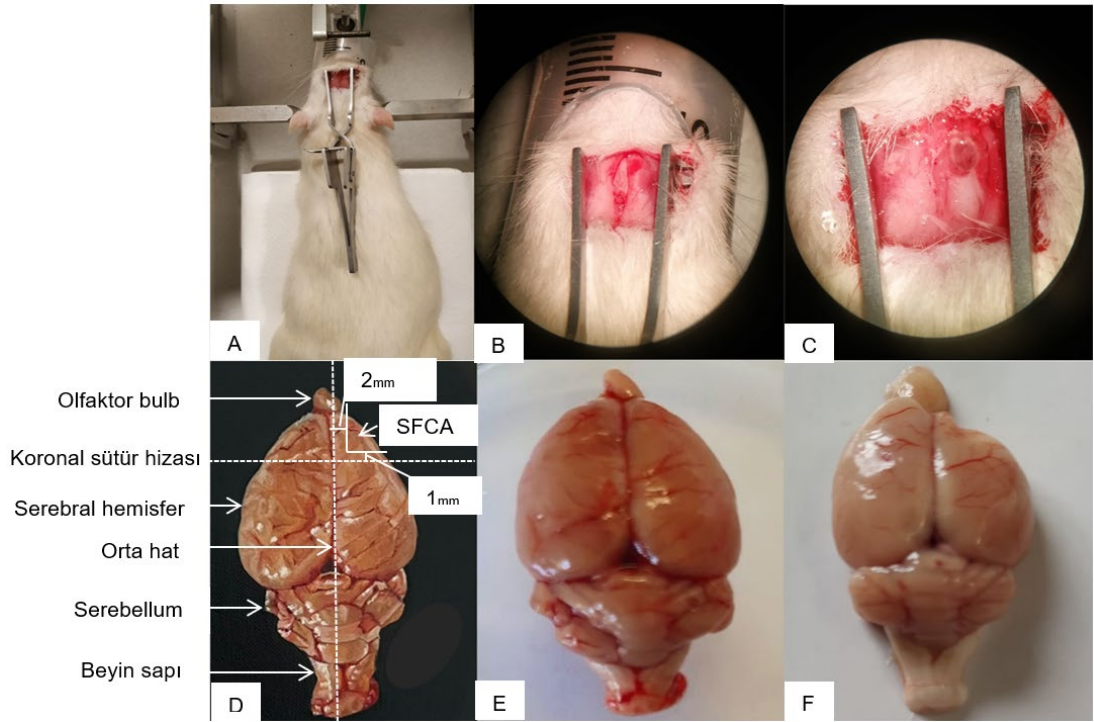
- 1- Sham grubu:** Sınırları sağda koronal sütün 1 mm önü ve sagittal sütün 2 mm laterali olacak şekilde sağ frontal kraniyotomi yapılan ve sağ frontal lobektomi uygulanmayan grup.
- 2- CBH grubu:** Sağ frontal kraniyotomi uygulandıktan sonra sağ frontal lobektomi yapılan grup. Bu gruptaki hayvanlar 3 gruba ayrıldı:
  - Grup 2a: CBH+ Serum Fizyolojik (SF) (kontrol grubu)
  - Grup 2b: CBH+FSLLRY-NH2 (tedavi grubu)
  - Grup 2c: CBH+FSLLRY-NH2+AC55541 (mekanizma grubu)

### **A: Sıçanda Cerrahi Beyin Hasarı Modeli**

Sıçanlar deney gününe kadar, sıcaklığı 21 °C'de olan bir odada ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngüsünde ve tek kafeste maksimum dört sıçan olacak şekilde, cerrahi öncesi 1 gün su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular. Sıçanlar rastgele Sham ve CBH gruplarına ayrılarak Sham grubuna sadece sağ frontal kraniyotomi, CBH grubuna ise sağ frontal kraniyotomi takiben kısmi sağ frontal lobektomi uygulandı.

Sıçanlar izofloran (Isoflurane, Abbott Labs, Queenborough, İngiltere) ile derin sedatize edildikten (indüksiyon için %4, idame için %2) sonra prone pozisyonda stereotaktik başlığa alındı (Şekil 2-A). Anestezi derinliği her 15

dakikada bir kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi. Cerrahi mikroskop (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) altında orta hat insizyonu yapıldı (Şekil 2-B) ve sağ frontal bölge ortaya konulduktan sonra 5x5 mm boyutlarındaki sağ frontal kraniyotomi (Şekil 2-C) takiben dura açıldı. Sınırları sağda koronal sütürün 1 mm önü ve sagittal sütürün 2 mm laterali olacak şekilde sağ frontal lobektomi yapıldı (Şekil 2-D, 2-F). Rezeksiyonu takiben SF ile irrigasyon yapılarak kanama kontrolü sağlandı. Kanama kontrolü sonrası cilt primer suture edildi. Sham grubuna aynı şartlar altında, anesteziyi takiben, dura açılmadan ve frontal lob rezeksiyonu yapılmadan sadece sağ frontal kraniyotomi uygulandı (Şekil 2-E). Her sıçanın numarası kuyruğuna yazıldı ve sıvı replasman amacı ile postoperatif dönemde subkutan 1cc SF verildi.



**Şekil-2:** **A:** Hayvan pozisyonu, **B:** Orta hat insizyonu, **C:** Sağ frontal kraniyotomi, **D:** CBH modelinin şematik şekli, **E:** Sham model örneği, **F:** CBH model örneği, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **SFCA:** Sağ Frontal Cerrahi Alanı.

## **A.1: Deney Protokolü**

Denekler seyir, 24-saat son durum, 72-saat son durum ve mekanizma çalışmaları için rastgele 4 gruba ayrıldı. Deney gruplarına göre hayvanların dağılımı Tablo-1 de sunulmuştur.

### **A.1.1: Deney 1 (Seyir Çalışması)**

Denekler Sham grubunda cerrahiye takiben 24. saatte, CBH grubunda 6., 12., 24. ve 72. saatlerde sakrifiye edildi. Elde edilen SFCA örneklerinde WB yöntemi ile mast hücre triptazı ve PAR-2'nin endojen salınımı incelendi (n=4/grup). (Şekil 3-A)

### **A.1.2: Deney 2 (24 Saat Son Durum Çalışması)**

Bu çalışmada CBH'ı takiben 24. saat nörolojik son durum ve beyin ödemi incelendi. 24. saat son durum çalışması için sıçanlar rastgele 3 gruba ayrıldı: Sham, CBH+SF, CBH+FSLLRY-NH2 (50 µg/sıçan, i.n.) (n= 6/grup). CHB'ndan 1 saat sonra PAR-2 inhibitörü [FSLLRY-NH2 (50 µg/sıçan)] i.n. yolla uygulandı. PAR-2 inhibisyonunun KBB üzerinde olan koruyucu etkisi CBH'dan 24 saat sonra deneklerin beyinleri çıkartılarak elde edilen SFCA örneklerinde BSI'ne ek olarak PAR-2, albumin ve KBB protein (okludin, klaudin-5) ekspresyonunun WB yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile doğrulandı (n=6/grup) (Şekil 3-B).

### **A.1.3: Deney 3 (72 Saat Son Durum Çalışması)**

Bu çalışmada CBH'ı takiben 72. saat nörolojik son durum ve beyin ödemi incelendi. 72 saat son durum çalışması için, sıçanlar rastgele 3 gruba ayrıldı: Sham, CBH+SF, CBH+FSLLRY-NH2 (50 µg/sıçan, i.n.) (n= 4/grup). CHB'ndan 1 saat sonra PAR-2 inhibitörü [FSLLRY-NH2 (50 µg/sıçan)] i.n. yolla uygulandı. PAR-2 inhibisyonunun KBB üzerinde olan koruyucu etkisi CBH'dan 72 saat sonra deneklerin beyinleri çıkartılarak elde edilen SFCA örneklerinde BSI'ne ek olarak PAR-2, albumin ve KBB protein (okludin,

klaudin-5) ekspresyonunun WB yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile doğrulandı (n=4/grup) (Şekil 3-C).

#### **A.1.4: Deney 4 (Mekanizma Çalışması)**

Mekanizma çalışması için CBH'ı takiben deneklerin beyinleri çıkartılarak beyin ödemi ve SFCA örneklerinde WB yöntemi kullanılarak yolak proteinlerinin (PAR-2, albumin, okludin ve kludin-5) ekspresyonu incelendi. Bu çalışma için, sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı: Sham, CBH+SF, CBH+FSLLRY-NH<sub>2</sub> (50 µg/sıçan, i.n.), CBH+FSLLRY-NH<sub>2</sub> (50 µg/sıçan, i.n.)+AC55541 (30 µg/sıçan, i.n.) (n= 6/grup). Mast hücre triptazının CBH sonrası KBB üzerine yıkıcı etkisinin PAR-2 mediyatörlüğünde gerçekleştiğinin ve FSLLRY-NH<sub>2</sub> ile sağlanan nöroprotektif etkinin PAR-2 inhibisyonuna bağlı olduğunun teyit edilmesi amacıyla selektif PAR-2 inhibitörü (FSLLRY-NH<sub>2</sub>) ve selektif PAR-2 agonisti (AC55541) birlikte kullanıldı (Şekil 3-D).

**Tablo-1:** Deney planlanması ve grupların dağılımı.

		Gruplar	M (%)	EE (%)
Deney 1	Seyir çalışması (6, 12, 24 ve 72. saatlerde)	Grup 1 (n=4)	0	0
	WB (Triptaz, PAR-2)	Grup 2a (n=4/grup)	4	0
Deney 2	24 saat son durum	Grup 1 (n=6)*	0	0
	(ND testleri, BSI)	Grup 2a (n=6)*	5	4
		Grup 2b (n=6)*	8	0
	WB	Grup 1 (n=6)**	1	0
	(PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5)	Grup 2a (n=6)**	3	0
		Grup 2b (n=6)**	0	0
Deney 3	72 saat son durum	Grup 1 (n=4)	0	0
	(ND testleri, BSI)	Grup 2a (n=4)	3	4
		Grup 2b (n=4)	1	0
	WB	Grup 1 (n=4)	0	0
	(PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5)	Grup 2a (n=4)	4	0
		Grup 2b (n=4)	2	0
Deney 4	Mekanizma çalışması	Grup 1 (n=6) *	0	0
	(ND testleri, BSI)	Grup 2a (n=6) *	0	0
		Grup 2b (n=6) *	0	0
		Grup 2c (n=6)	1	5
	Mekanizma çalışması	Grup 1 (n=6) **	0	0
	WB (PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5)	Grup 2a (n=6) **	0	0
		Grup 2b (n=6) **	6	0
		Grup 2c (n=6)	4	0
Toplam		n=128***	42	13
Ort±SS			2±2,37	0,6±1,6

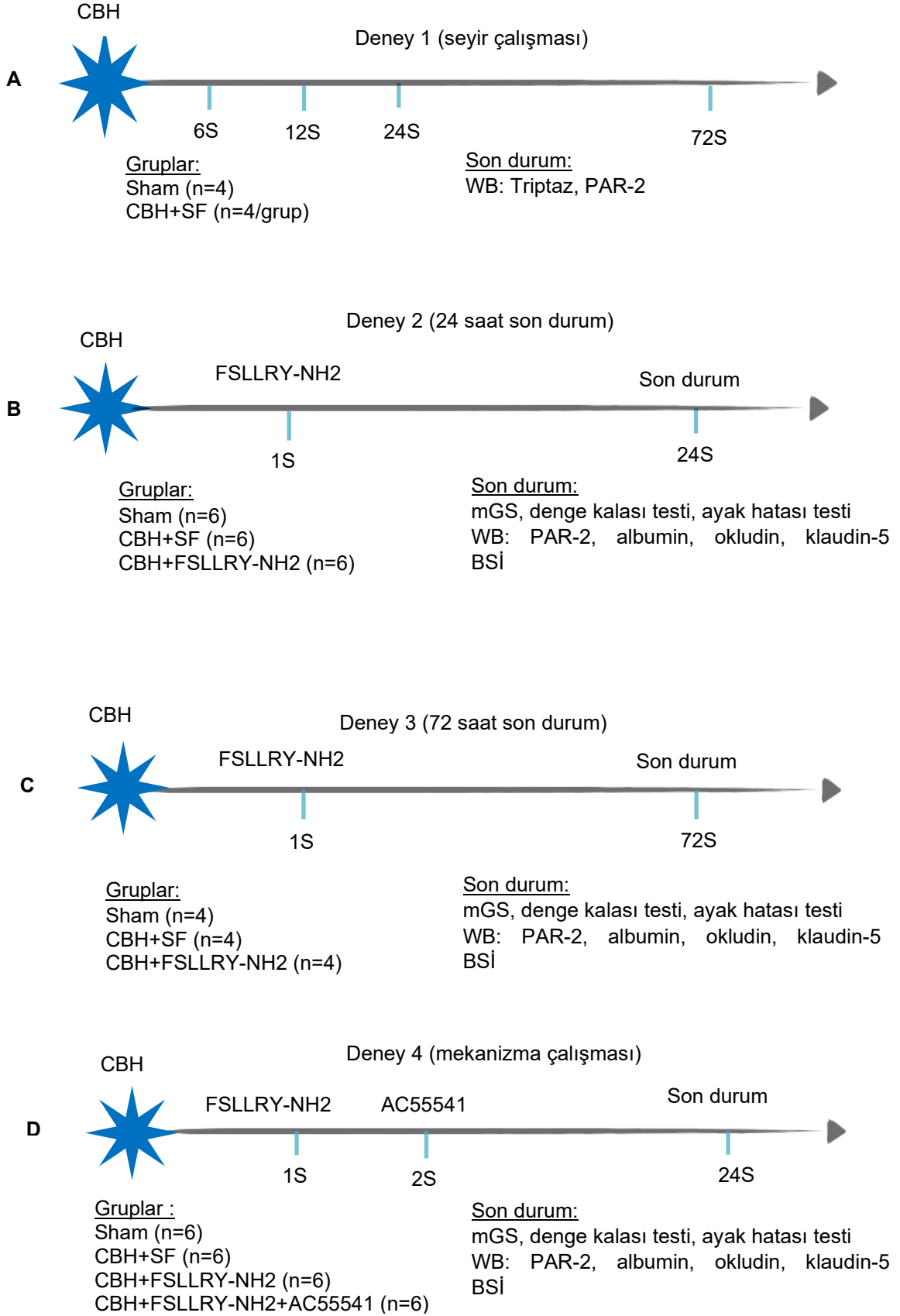
**BSİ:** Beyin Su İçeriği, **EE:** Ekarte edilen, **M:** Mortalite, **ND:** Nörodavranış, **Ort±SS:** Ortalama±Standart Sapma, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot, \*24 saat son durum ve mekanizma çalışmalarındaki BSI değerlendirmesi için kullanılan denekler ortaktır. \*\*24 saat son durum ve mekanizma çalışmalarındaki WB değerlendirmesi için kullanılan denekler ortaktır. \*\*\*Çalışma için gereken denek sayısı 128 (ortak kullanım nedeniyle 92'e düştü. Ex olan ve yeterli lezyon oluşmaması nedeniyle çalışma dışı bırakılan denek grupları tamamlamak için eklenmiş ve çalışma toplamda 143 adet denek ile tamamlanmıştır).

**Grup 1:** Sham grubu.

**Grup 2a:** CBH+SF (kontrol) grubu.

**Grup 2b:** CBH+FSLLRY-NH2 (tedavi grubu).

**Grup 2c:** CBH+FSLLRY-NH2+AC55541 (mekanizma grubu).



**Şekil-3: A:** Seyir dönemi, **B:** 24 saat son durum, **C:** 72 saat son durum, **D:** Mekanizma çalışması, **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.



## **A.2: İntranazal İlaç Uygulaması**

Tüm ilaçlar salin içerisinde dilüe edildi ve intranazal yol ile uygulandı. Kısaca, sıçanlar %2 izofluran anestezisi altında supin pozisyonda yatırıldı. Daha sonra, AC55541 (30 µg; CBH' dan 2 saat sonra) ya da FSLLRY-NH2 (50 µg; CBH' dan 1 saat sonra) uygulandı (9). Toplam hacim 30 µL ve her seferinde 1 burun deliğine 5 µL olacak şekilde 2 dakika aralıklarla ilaçlar uygulandı.

## **A.3: Beyin Su İçeriğinin Değerlendirilmesi**

BSİ değerlendirmesi Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda, deney protokolünden bağımsız bir fizyolog tarafından yapıldı. BSİ yaş/kuru yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Kısaca, hayvanlar derin anestezi altında dekapite edildikten hemen sonra beyin dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Yaş ağırlığı elde etmek için her numune tartıldı ve sonuçlar kaydedildi. Beyinler 100°C' de 48 saat fırın' da bekletildi ve kuru ağırlığı elde etmek için tekrar tartıldı ve sonuçlar kaydedildi. Ağırlıklar BSİ yüzdesi şu şekilde hesaplanmıştır: (yaş ağırlık – kuru ağırlık) / yaş ağırlık× 100% (15).

## **B: Nörolojik Sonuçların Değerlendirilmesi**

Nörodavranış testleri kör bir araştırmacı tarafından uygulandı. mGS (16), denge kalası (17) ve ayak hatası (18) testleri olarak nörolojik durumun değerlendirilmesinde kullanıldı.

### **B.1: mGS**

Sensorimotor defisitler, kafes içi aktivitenin değerlendirilmesi, propriyosepsiyon, bıyık dokunma yanıtı, ekstremitte simetrisi, dönme, ön patinin uzatılması ve tırmanma ile değerlendirildi. Bu testin toplam skoru 3 - 21 arasında değişmektedir. Daha yüksek skorlar daha iyi nörolojik durumu göstermektedir (Tablo-2).

**Tablo-2:** Modifiye Garcia Testi.

mGS	0	1	2	3
Kafes içi aktivite	Akinezi	Minimal hareket	1-2 duvara çıkma	3-4 duvara çıkma ya da 1-2 duvara çıkıp keşfetmek için yükselme
Propriyosepsiyon	Yanıt yok	Unilateral yanıt	Bilateral zayıf yanıt ya da sağ canlı sol zayıf yanıt	Bilateral canlı yanıt
Bıyık dokunma yanıtı	Yanıt yok	Unilateral yanıt	Bilateral zayıf yanıt ya da sağ canlı sol zayıf yanıt	Bilateral canlı yanıt
Ekstremitte simetrisi	Sol ön ayak ve arka ayakta tamamen fleksiyon yanıt	Sol ön ayakta fleksiyon ve arka ayakta ekstansiyon yanıt veya tam tersi	Sol taraf sağdakinden daha az veya daha yavaş uzanmakta	Tüm ekstremiteler simetrik olarak uzanmakta
Dönme	Dönmüyor	Eşitsiz dönme	Bilateral dönüş eşit ancak <45°	Bilateral dönüş eşit ancak >45°
Ön pençe uzatılması	Sol ön ayakta hareket yok	Daire çizerek hareket etmek	Bir yöne hareket etmek	Hızlıca simetrik olarak ileri doğru yürümek
Tırmanma	Zayıf kavrama ve düşme	Yana ve aşağı doğru hareket etme	Zayıf veya güçlü tırmanıyor ancak zirveye çıkamıyor	Zirveye çıkabiliyor

**mGS:** Modifiye Garcia Skoru (16).

## **B.2: Denge Kalası Testi (Beam balance test)**

Motor denge ve koordinasyon denekler silindirik kalas üzerinde 60 sn boyunca yürütülerek değerlendirildi. Her hayvan yürüme mesafesi ve bu mesafeyi yürümesi için geçen zamana bağlı olarak 0 ile 5 arasında bir puan aldı (Tablo-3). Yüksek skor daha iyi performansın göstergesidir.

**Tablo-3:** Denge Kalası Testi (17).

<b>Denge kalası testi 2,25 metre</b>	
0	$\leq 40$ saniye, platformdan düşüyor.
1	$\geq 40$ saniye, platformda kalabiliyor.
2	Platformun yarısından daha az mesafeye $\leq 40$ saniyede geçiyor ve $\geq 25$ saniye kalabiliyor.
3	Platformun yarısına $\leq 40$ saniyede ulaşıyor ve $\geq 25$ saniye kalabiliyor.
4	$\leq 40$ saniyede platformun sonuna ulaşıyor.
5	$\leq 25$ saniyede platformun sonuna ulaşıyor.

### **B.3: Ayak Hatası Testi (Foot fault test)**

Lökomotor fonksiyon, denekler yatay olarak yerden yüksek bir merdivene konularak değerlendirildi. Sıçanlar bu merdivende 2 dk süre ile yürütüldü ve video çekimi yapıldı. Toplam adım sayısı ve her ekstremiten için yanlış yerleştirilen adım sayısı kaydedildi. Ardından sol ön ve arka ekstremitenin yanlış yerleştirilen toplam adım sayısının yüzdesi hesaplandı. Ayrıca dört ekstremitenin yanlış yerleştirilen toplam adım sayısının yüzdesi hesaplandı.

### **C: İmmünblotlama incelemesi**

İmmünohistokimyasal değerlendirme Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda deney protokolünden bağımsız bir fizyolog tarafından yapıldı. WB yöntemi kullanılarak yolak proteinlerinin ekspresyonu incelendi.

#### **C.1: Western Blot Yöntemi**

Sıçanlar derin anestezi altında 100 ml soğuk fosfat tamponlu salinle (PBS, 0.01 M, pH 7.4) transkardiyak olarak perfüze edildikten sonra, beyinleri hızlıca çıkartıldı. SFCA'dan elde edilen numuneler, 1:10 oranla soğuk PBS içinde homojenize edildi. Örnekler 14.000 g'de 4 °C'de 30 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatantlar toplandı ve WB analizi için -80 °C'de saklandı (10). Her numunenin total protein miktarı, BCA protein kiti (Thermo Scientific,

Waltham, MA, ABD) kullanılarak belirlendi ve numuneler 95°C'de 5 dakika Laemmler tamponu ile inkübe edildi. Eşit miktarda (50 µg/ml) proteine sahip homojenatlar Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi yardımıyla elektroforetik olarak yürütüldü. Protein bantlarının jel üzerinde ayrışması ve takiben poliviniliden diflorür membranlara (CAT#IPVH00010, Millipore, ABD) aktarılması sağlandı. Membranlar tris tamponlu salin ve tween 20 (TBST) içinde çözdürülmüş %5 yağsız kuru süt (Carnation, Glendale, CA, ABD) çözeltisi ile bloke edildi. Membranlar gece boyunca primer anti-PAR-2 (1:500, Atlas Biyokimya-AB06967), anti-triptaz (1:500, Santa Cruz Biyoteknoloji-DF6758), anti-kludin-5 (1:500, Santa Cruz Biyoteknoloji-AF5216), anti-okludin (1:1000, Santa Cruz Biyoteknoloji-DF7504) ve anti-albumin (1:1000, Santa Cruz-DF6396) antikoruyla inkübe edildi ve ertesi gün TBST solüsyonu ile yıkandıktan sonra primerlere uygun sekonder antikorla 1 saat boyunca muamele edildi. İnkübasyonun sonunda kemilüminesans solüsyonu ile inkübe edilerek membranların üzerindeki protein bantları dijital bir tarayıcıda (C-Digit Western Blot Scanner, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, ABD) okutuldu. İlgili proteinlerin optik dansiteleri sayısal değere dönüştürüldü ve sonuçlar yarı-kantitatif olarak ifade edildi. Eşit miktarda protein yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için yapısal bir protein olan β-aktin proteininin analizi yapıldı.

#### **D: İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) programında yapıldı. Nicel veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. 2 grubun bağımsız ortalamalarını karşılaştırmak için Student t-test kullanılırken, ikiden fazla grup karşılaştırmasında tek yönlü ANOVA kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

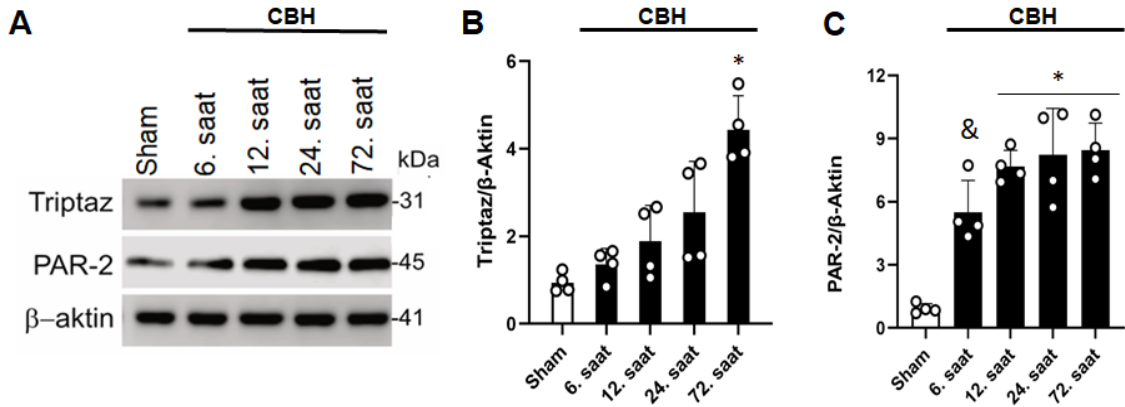
## BULGULAR

### **Mortalite**

Bu çalışmada sunulan deneyleri tamamlamak için 128 adet denek gerekmektedir. 24 saat son durum ve mekanizma çalışmalarındaki BSİ ve WB değerlendirmeleri için kullanılan denekler ortak olduğundan toplamda 92 hayvan ile gruplar tamamlanmıştır. Ex olan 42 (%29) hayvan ve yeterli lezyon oluşmaması nedeniyle çalışma dışı bırakılan 13 (%9) hayvan grupları tamamlamak için eklenmiş ve bu çalışma toplamda 143 adet sıçan ile tamamlanmıştır. Bunlar içerisinde 122 deneğe CBH, 21 deneğe ise Sham cerrahisi uygulandı. Mortalite oranı Sham grubunda %4,7 (n=1), CBH grubunda %33,6 (n=41) olarak kaydedildi.

### **CBH sonrası triptaz ve PAR-2 protein ekspresyonu arttı.**

Deneklerden cerrahiyi takiben 6., 12., 24. ve 72. saatlerde alınan SFCA örneklerinde WB yöntemi ile mast hücre triptaz ve PAR-2'nin endojen salınımı incelendi. CBH'ını takiben mast hücre triptazında tüm zamanlarda artış olduğu görüldü. Bu artış CBH grubunda Sham grubuna kıyasla 72. saatte istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4-A, 4-B). Benzer şekilde CBH'ını takiben PAR-2 protein miktarının 6. saatten 72. saate kadar önemli ölçüde arttığı görüldü. Bu artış, CBH grubunda Sham grubuna kıyasla 12., 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4-A, 4-C).



**Şekil-4:** CBH'ını takiben SFCA'da endojen triptaz ve PAR-2'nin geçici ekspresyonu. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

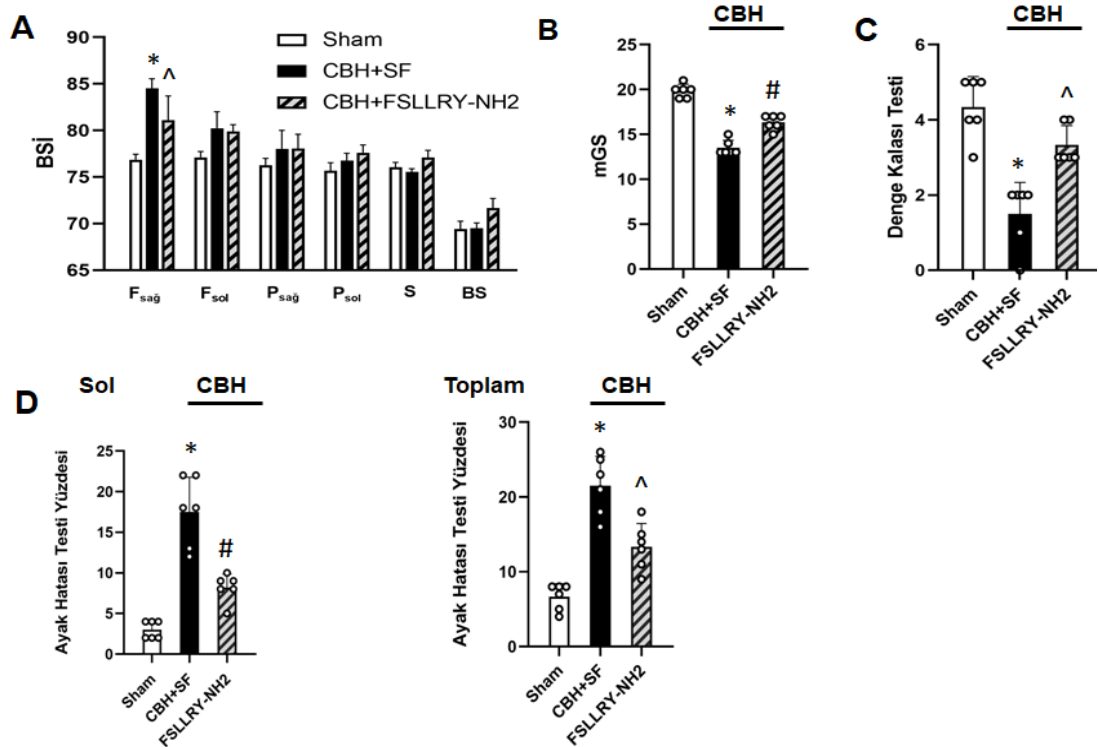
CBH'ını takiben SFCA'da endojen triptaz ve PAR-2 ekspresyonunun temsili WB görüntüsü (A), CBH'ını takiben SFCA'da endojen triptaz ekspresyonunun kantitatif analizi (B), CBH'ını takiben SFCA'da endojen PAR-2 ekspresyonunun kantitatif analizi (C). CBH takiben 6. saatte başlayıp 72. saate kadar giden triptaz (B) ve PAR-2 (C) değerlerinde artış saptandı.  $\&p < 0.05$  vs Sham,  $*p < 0.0001$  vs Sham. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **SFCA:** Sağ Frontal Cerrahi Alanı, **WB:** Western Blot.

### PAR-2 inhibisyonu, CBH'dan 24 saat sonra KBB geçirgenliğini azaltarak nörodavranış testlerini iyileştirdi

CBH'ını takiben 24. saatte kontrol grubunda BSİ Sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 5-A). CBH'ını takiben 24. saatte, kontrol grubunda Sham grubuna göre tüm nörodavranış testlerinde (Şekil 5-B, 5-C, 5-D) bozulma saptandı. PAR-2 inhibisyonu (CBH+FSLLRY-NH<sub>2</sub>) uygulanan tedavi grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak BSİ'de azalma ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5-A) ve nörolojik testlerde iyileşme ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$ ) (Şekil 5-B, 5-C, 5-D) görüldü.

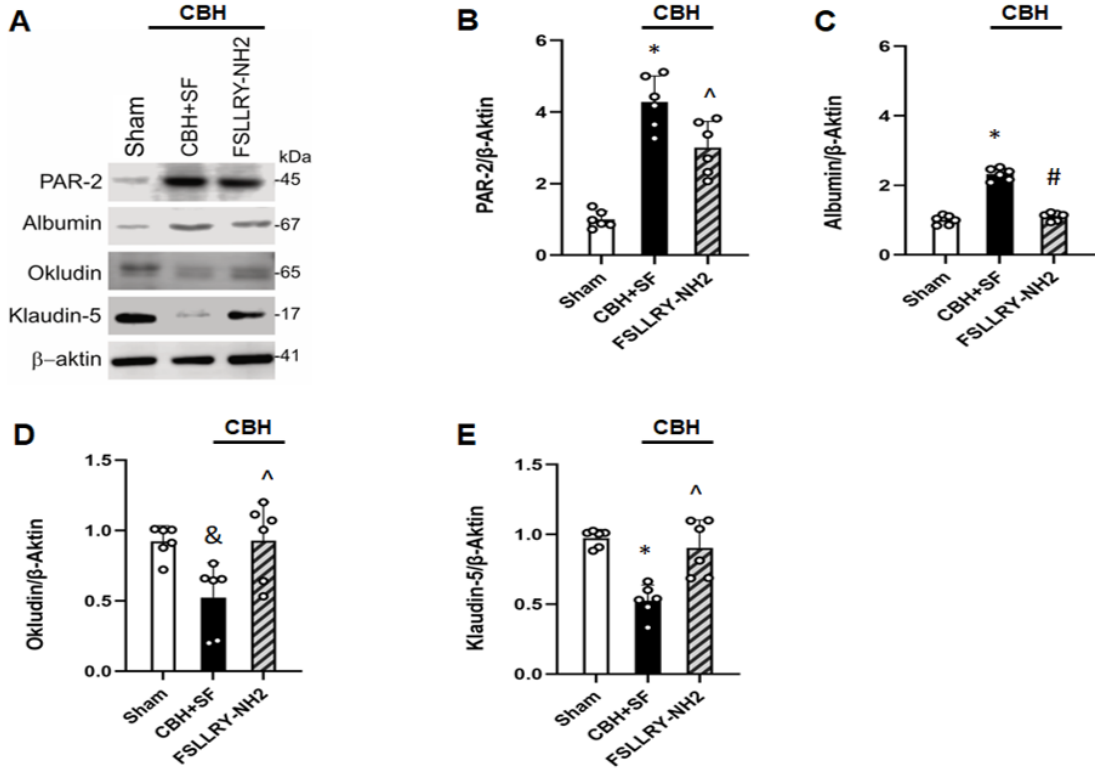
CBH'dan 24 saat sonra kontrol grubunda Sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda PAR-2 ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 6-A, 6-B) ve albumin (Şekil 6-A, 6-C) seviyelerinde artış ( $p < 0.0001$ ), KBB protein (okludin ve kludin-5) seviyelerinde ise azalma ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.0001$ ), (Şekil 6-A, 6-D, 6-E) saptandı. PAR-2 inhibisyonu amacı ile i.n. FSLLRY-NH<sub>2</sub> uygulanmasını

takiben istenilen şekilde PAR-2 seviyesinde anlamlı azalma sağlandı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 6-A, 6-B). PAR-2 inhibisyonu uygulanan tedavi grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda albumin (Şekil 6-A, 6-C) seviyesinde azalma ( $p < 0,0001$ ) saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulanmasıyla birlikte kontrol grubuna kıyasla okludin ve klaudin-5 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda artış ( $p < 0.05$ ) (Şekil 6-A, 6-D, 6-E) görüldü.



**Şekil-5:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonunun BSİ ve nörodavranış testleri üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi.  $n=6$ /grup.

BSİ (A), mGS (B), denge kalası testi (C), sol ve toplam ayak hatası testi (D). CBH grubunda, Sham grubuna kıyasla BSİ'de artış ve tüm nörodavranış testlerinde önemli ölçüde disfonksiyon saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte BSİ'de azalma ve nörodavranış testlerinde iyileşme elde edildi. \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, # $p < 0.0001$  vs CBH. **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **BS:** Beyin Sapı, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>:** Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>:** Sol Frontal, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>:** Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>:** Sol Parietal, **S:** Serebellum.



**Şekil-6:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonunun KBB geçirgenliği üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (A), PAR-2 WB kantitatif analizi (B), albumin WB kantitatif analizi (C), okludin WB kantitatif analizi (D), klaudin-5 WB kantitatif analizi (E). CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde PAR-2 ve albumin (B, C) değerlerinde artış, PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte azalma saptandı. CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde okludin ve klaudin-5 (D, E) değerlerinde azalma, FSLRY-NH2 uygulamakla birlikte artış saptandı. \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, # $p < 0.0001$  vs CBH, & $p < 0.05$  vs Sham. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB:** Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB :** Western Blot.

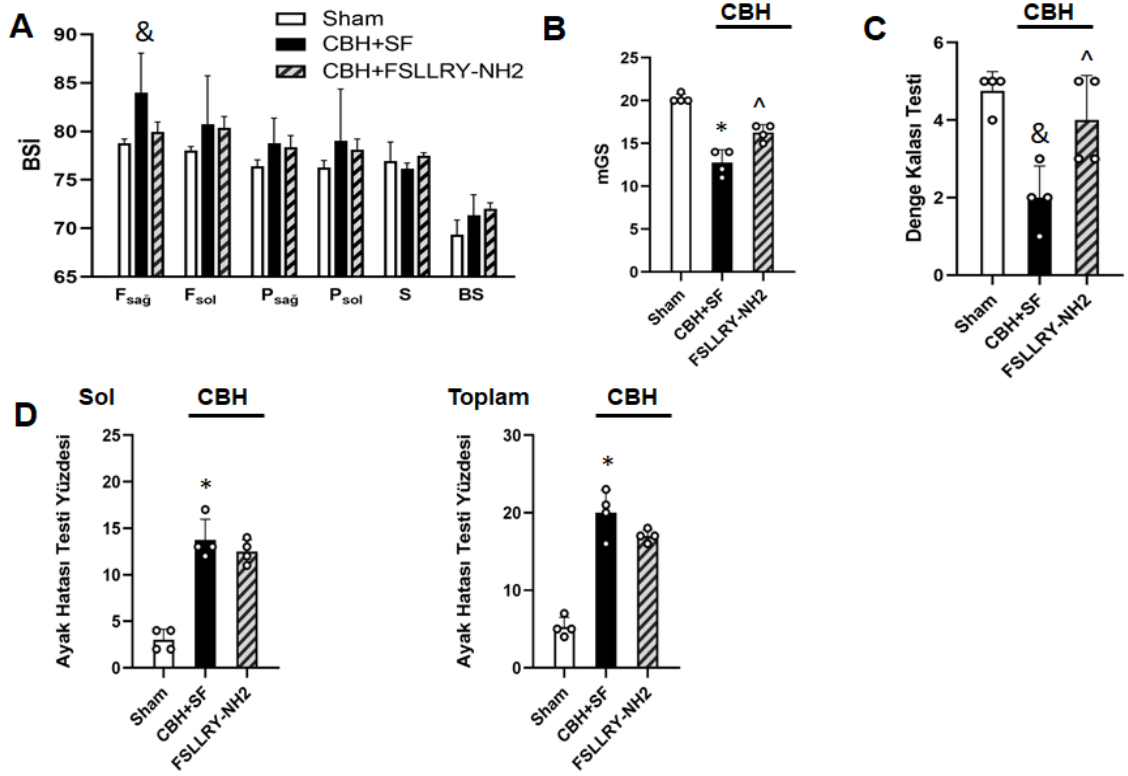
### PAR-2 inhibisyonu, CBH'dan 72 saat sonra KBB geçirgenliğini azaltarak nörodavranış testlerini iyileştirdi.

CBH'dan 72 saat sonra Sham grubuna göre kontrol grubunda BSI'de istatistiksel olarak anlamlı oranda artış ( $p < 0.05$ ) (Şekil 7-A), nörodavranış testlerinde ise anlamlı oranda bozulma saptandı ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$ ) (Şekil 7-B, 7-C, 7-D). PAR-2 inhibisyonu ile kontrol grubuna göre BSI'de azalma (Şekil 7-A) sağlandı, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı zamanda PAR-2 inhibisyonu uygulanan grupta, kontrol grubuna göre nörodavranış testlerinde anlamlı iyileşme tespit edildi ( $P < 0.05$ ) (Şekil 7-B, 7-



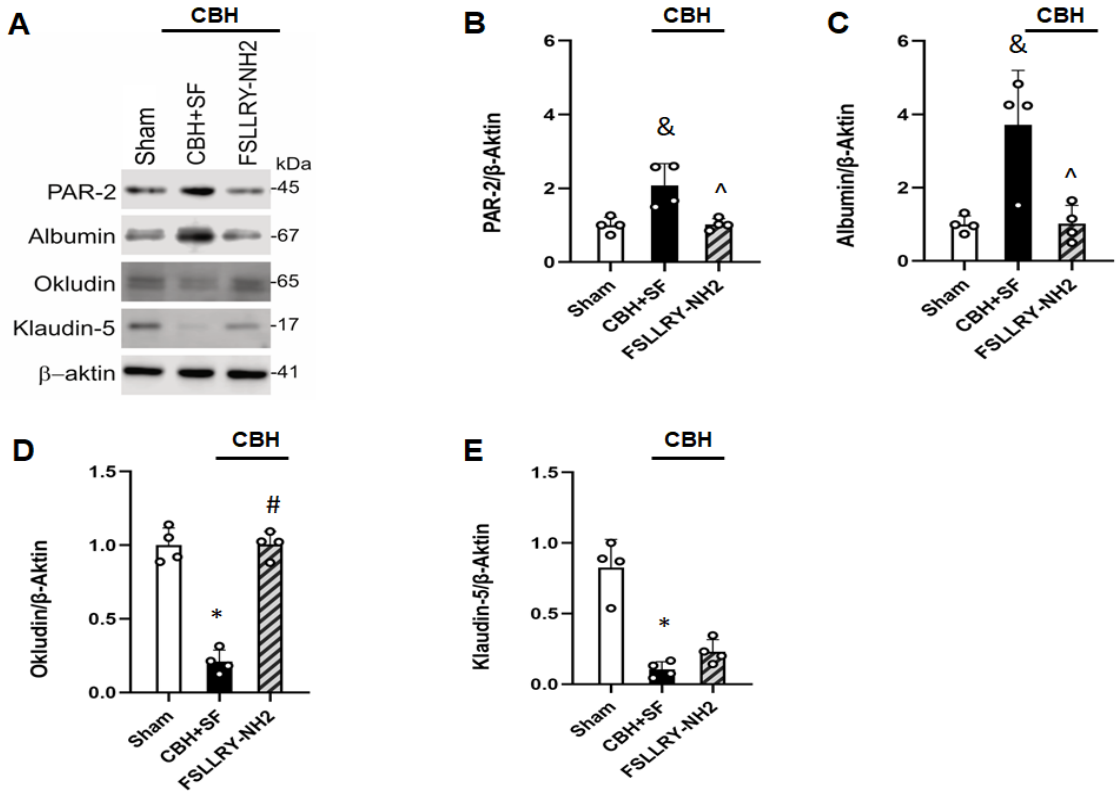
C). Nörodavranış testleri içerisinde sadece ayak hatası testinde sağlanan iyileşme (Şekil 7-D) istatistiksel olarak anlamlı fark göstermedi.

CBH'ı takiben 72. saatte endojen PAR-2 ekspresyonunun Sham grubuna kıyasla anlamlı oranda arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 8-A, 8-B). KBB hasarının bir göstergesi olarak yine CBH grubunda Sham grubuna kıyasla albumin seviyesinde anlamlı artış ( $p < 0.05$ ) (Şekil 8-A, 8-C), KBB protein (okludin, klaudin-5) seviyelerinde ise anlamlı oranda azalma ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 8-A, 8-D, 8-E) saptandı. CBH sonrası PAR-2 inhibisyonunu takiben 72. saatte tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalan PAR-2 ile (Şekil 8-A, 8-B) ve albumin (Şekil 8-A, 8-C) seviyesinde azalma ( $p < 0.05$ ) sağlandı. PAR-2 inhibisyonu ile tedavi uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla okludin seviyesinde anlamlı oranda artış ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 8-A, 8-D) izlendi. Aynı şekilde tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla klaudin-5 seviyesinde artış saptandı (Şekil 8-A, 8-E), fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.



**Şekil-7:** CBH'ını takiben 72. saatte PAR-2 inhibisyonunun, BSi ve nörolojik fonksiyonlar üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

BSi (A), mGS (B), denge kalası testi (C), sol ve toplam ayak hatası testi (D). CBH grubunda Sham grubuna kıyasla BSi'de artış ve tüm nörodavranış testlerde bozulma saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte BSi'de azalma ve nörodisfonksiyonda iyileşme elde edildi. &p<0.05 vs Sham, \*p<0.0001 vs Sham, ^P<0.05 vs CBH, **BSi**: Beyin Su İçeriği, **BS**: Beyin Sapı, **CBH**: Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>**: Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>**: Sol Frontal, **mGS**: Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2**: Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>**: Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>**: Sol Parietal, **S**: Serebellum.



**Şekil-8:** PAR-2 inhibisyonunun CBH'ını takiben 72. saatte KBB geçirgenliği üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (A), PAR-2 WB kantitatif analizi (B), albumin WB kantitatif analizi (C), okludin WB kantitatif analizi (D), klaudin-5 WB kantitatif analizi (E). CBH takiben 72. saatte WB kantitatif analizinde PAR-2 ve albumin (B, C) değerlerinde artış, PAR-2 inhibisyonu uygulamakla birlikte azalma saptandı. CBH takiben 72. saatte WB kantitatif analizinde okludin ve klaudin-5 (D, E) değerlerinde azalma, PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte artış saptandı. \* $p<0.0001$  vs Sham, & $p<0.05$  vs Sham, ^ $p<0.05$  vs CBH, # $p<0.0001$  vs CBH, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB:** Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.

### FSLRY-NH2, PAR-2 inhibisyonu ile KBB hasarını azalttı

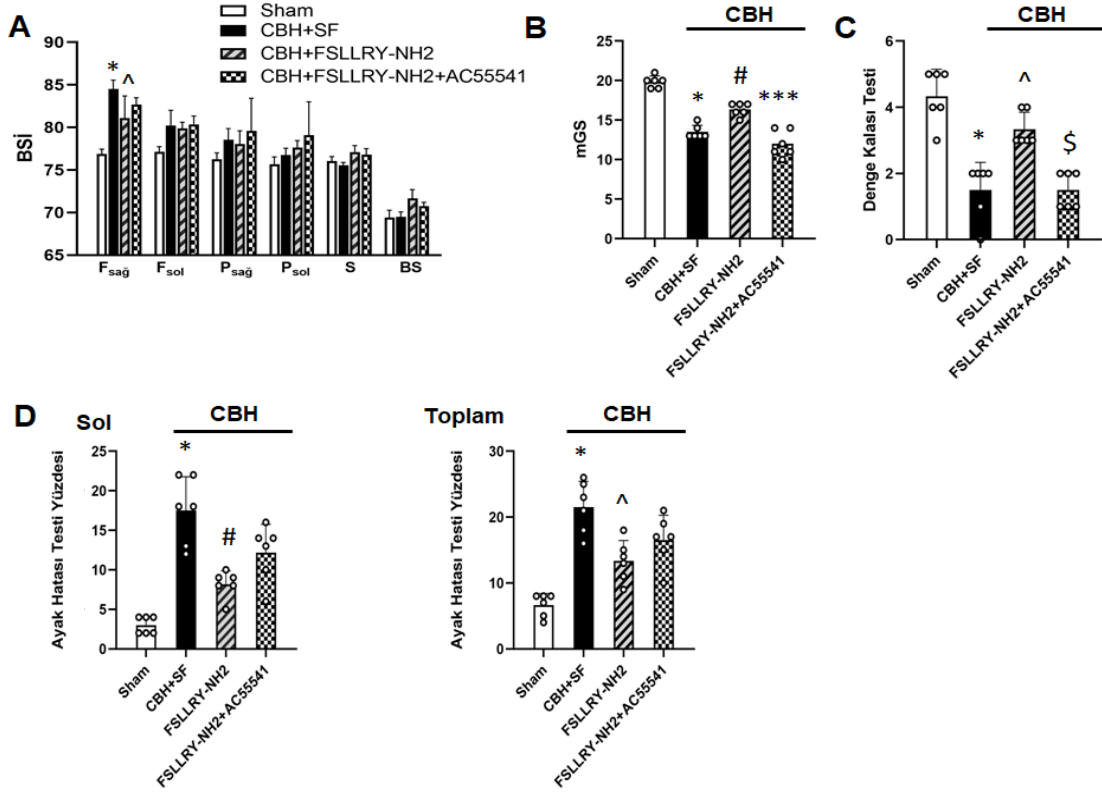
CBH'ı takiben 24. saatte kontrol grubunda, Sham grubuna kıyasla BSİ'de istatistiksel olarak anlamlı oranda artış ( $p<0.0001$ ) (Şekil 9-A) ve nörolojik testlerde bozulma ( $p<0.0001$ ) (Şekil 9-B, 9-C, 9-D) saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulanan tedavi grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak BSİ'de azalma ( $p<0.05$ ) (Şekil 9-A) ve nörodavranış testlerinde iyileşme ( $p<0.0001$ ,  $p<0.05$ ) (Şekil 9-B, 9-C, 9-D) görüldü. CBH'ını

takiben AC55541 (PAR-2 aktivatörü) uygulanan mekanizma grubunda FSLLRY-NH2 (PAR-2 inhibitörü) uygulaması ile sağlanan BSI'deki azalma geri döndürüldü ve BSI'de artış (Şekil 9-A) saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Benzer şekilde CBH'ını takiben FSLLRY-NH2 ile birlikte AC55541 uygulanan mekanizma grubunda tedavi grubuna göre nörodavranış testlerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda bozulma saptandı (Şekil 9-B, 9-C). Yani, CBH sonrası FSLLRY-NH2 ile PAR-2 inhibisyonu uygulanan tedavi grubunda elde edilen nörolojik fonksiyonlardaki iyileşmenin, FSLLRY-NH2'ye ek olarak AC55541 ile PAR-2 aktivasyonu yapılan mekanizma grubunda geri döndüğü görüldü. Mekanizma grubunda ayak hatası testi (şekil 9-D) dışındaki tüm davranış testlerindeki bozulma istatistiksel olarak anlamlı idi.

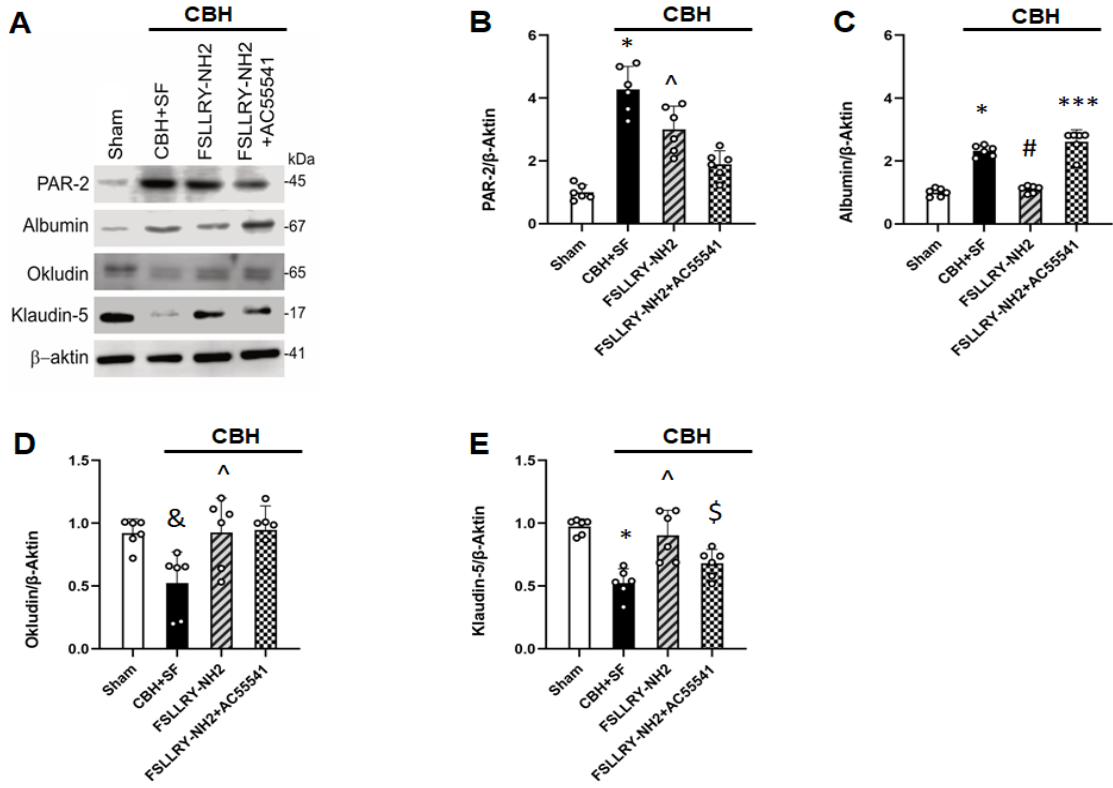
CBH'den 24 saat sonra Sham grubuna kıyasla kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda WB yöntemi ile değerlendirilen PAR-2 (Şekil 10-A, 10-B) ve albumin (Şekil 10-A, 10-C) protein seviyelerinde artış ( $p<0.0001$ ), KBB protein (okludin ve klaudin-5) seviyelerinde ise azalma ( $p<0.05$ ,  $p<0.0001$ ) (Şekil 10-A, 10-D, 10-E) saptandı. FSLLRY-NH2 ile PAR-2 inhibisyonu uygulanan tedavi grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda PAR-2 ( $p<0.05$ ) (Şekil 10-A, 10-B) ve albumin ( $p<0.0001$ ) (Şekil 10-A, 10-C) protein seviyelerinde azalma saptandı. FSLLRY-NH2 tedavisi ile PAR-2 inhibisyonu sonrası tedavi grubunda kontrol grubuna göre okludin ve klaudin-5 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış ( $p<0.05$ ) (Şekil 10-A, 10-D, 10-E) görüldü. FSLLRY-NH2 tedavisi ile sağlanan albumin seviyesindeki azalma ve KBB protein ekspresyonundaki artışın FSLLRY-NH2'ye ek olarak AC55541 uygulaması ile sağlanan PAR-2 aktivasyonu sonucu geri döndürüldüğü görüldü. Yani, mekanizma grubunda tedavi grubuna kıyasla albumin seviyesinde anlamlı oranda artış ( $p<0.0001$ ) (Şekil 10-A, 10-C) sağlandı. Benzer şekilde, FSLLRY-NH2+AC55541 uygulanan mekanizma grubunda sadece FSLLRY-NH2 ile tedavi uygulanan gruba oranla klaudin-5 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma ( $p<0.05$ ) görülürken (şekil 10-A, 10-E) okludin

seviyesindeki (şekil 10-A, 10-D) azalma istatistiksel olarak anlamlı fark sağlayamadı.



**Şekil-9:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonu KBB hasarını azalttı. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

BSİ (A), mGS (B), denge kalası testi (C), sol ve toplam ayak hatası testi (D). AC55541 uygulanan grupta FSLRY-NH2 uygulanan gruba oranla BSİ'nde artış ve tüm nörodavranış testlerde önemli ölçüde disfonksiyon saptandı. \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, # $p < 0.0001$  vs CBH, \*\*\* $P < 0.0001$  vs FSLRY-NH2, \$ $p < 0.05$  vs FSLRY-NH2. **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **BS:** Beyin Sapı, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>:** Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>:** Sol Frontal, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>:** Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>:** Sol Parietal, **S:** Serebellum.



**Şekil-10:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonu WB yöntemi kullanılarak KBB hasarını azalttı. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (A), PAR-2 WB kantitatif analizi (B), albumin WB kantitatif analizi (C), okludin WB kantitatif analizi (D), klaudin-5 WB kantitatif analizi (E). CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde AC55541 uygulamakla birlikte albumin (C) değerinde artış saptandı. CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde AC55541 uygulamakla birlikte klaudin-5 (E) değerinde azalma saptandı. PAR-2 ve okludin (B, D) değerlerinde anlamlı bir fark elde edilemedi. \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, # $p < 0.0001$  vs CBH, \$ $p < 0.05$  vs FSLRY-NH2, \*\*\* $p < 0.0001$  vs FSLRY-NH2, & $p < 0.05$  vs Sham. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB:** Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroşirürjikal cerrahi teknikler ve teknolojik gelişmelere rağmen nöroşirürjikal girişimler (direkt travma, bipolar koagülasyon, ekartör kullanımı, hematoma gelişimi gibi nedenlere bağlı olarak) beyin dokusunda farklı derecelerde hasara neden olmaktadır (1). Bu nedenle, beyin dokusunu korumak için gösterilen tüm çabalara rağmen halen nöroşirürji operasyonlarından sonra nörolojik defisit gelişebilmektedir (4, 19). Nöroşirürjikal girişimler sonrasında oluşan ve genellikle KBB hasarına bağlı gelişen beyin ödemi (3, 20, 21) postoperatif dönemde en sık görülen komplikasyonlardandır (5, 21).

Nöroşirürjikal girişimlere beynin verdiği yanıt ve bu girişimler sonrasında beyinde oluşan değişiklikler hakkında bilgi edinmek için hayvan deney modelleri kullanılmıştır. Bunlar içerisinde ilk olarak 2007 yılında tanıtılmış olan ve sağ frontal kısmi lobektomi uygulamasına dayanan sıçan CBH modeli, insanlarda karşılaşılan nöroşirürjikal hasarı başarı ile taklit etmektedir (3). Öyle ki, sağ frontal kısmi lobektomi yapılan CBH modeli ile rutin beyin cerrahisi operasyonlarına bağlı oluşan ve beyin dokusunda görülen yaralanmalara yol açan nöroinflamasyon ve KBB hasarına bağlı beyin ödemi elde edilebilmiştir (1, 2, 22).

CBH modeli nöroşirürjikal girişimlere bağlı oluşan KBB hasarı ve bu durumun tedavisini araştırmaya izin vermesi sebebi ile KBB ilgili bilgi edinmek için oldukça uygundur (22). KBB stabilitesinde rol alan ve her zaman KBB hasarına karşı koruyucu rol oynayan faktörlerden en önemli olan sıkı bağlantı proteinleridir (SBP). SBP, endotel hücreler arasındaki iyonların paraselüler difüzyonunu kısıtlayarak KBB'nin yüksek transendotelial elektrik direncine yol açar. Endotelial SBP ana fonksiyonel bileşenleri olan klauidin-5 ve -12, boyut ve yük seçici hidrofilik paraselüler gözenekler oluşturur ve klauidin-5, küçük hücre içi geçirgenlikte önemli bir rol oynar. Buna dayanarak

SBP farklı nedenlerden dolayı bozulduğu zaman KBB'de hasar oluşması ve beyinde patoloji durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (23, 24).

Mast hücrelerinin ana salgı proteini olan triptazın, periferik immün sistem hücreleri, astrositler ve mikroglialardan sitokin salınımını tetiklediği gösterilmiştir. Triptaz mikroglia ve astrositler üzerindeki etkisinin, PAR-2 aktivasyonu ve bunu takiben salgılanan IL-6 ve TNF- $\alpha$  üzerinden olduğu gösterilmiştir (9). PAR-2, yedi transmembran domain G-protein bağlı reseptör ailesine aittir (10). PAR ailesinin PAR-1, PAR-2, PAR-3 ve PAR-4 olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır. Triptazın endojen reseptörü olarak bilinen PAR-2 triptaz ya da tripsin ile aktive olurken PAR ailesinin diğer üyeleri trombin ile aktive edilmektedir (9, 10, 25). PAR-2 esas olarak epitel ve endotel hücrelerinde, nötrofillerde, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde yaygın olarak ekspres edilir (26). PAR-2 aktivasyonunun KBB hasarına potansiyel katkılarını vurgulayan son dönem çalışmalarda, mast hücre triptazının, PAR-2 aracılığı ile beyin mikrovasküler endotelial hücrelerini aktive ettiği ve takiben de mediyatör salınımını artırarak KBB geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (11, 27).

Çalışmamız, sağ frontal lobektomi uygulanan hayvanlarda CBH sonrası cerrahi alan etrafında triptaz ve PAR-2 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, çalışmamız CBH'nin hem 24. hem de 72. saatlerinde SFCA'da BSI'nin arttığını ve bununla uyumlu olarak SFCA etrafında albumin protein seviyesinin arttığını, okludin ve kludin-5 protein seviyelerinin ise azaldığını gösterdi. Yani çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak sağ frontal kısmi lobektomi KBB hasarı, geçirgenliğinde artış ve dolayısı ile de BSI'de artış, yani beyin ödemi ile sonuçlandı (1, 2).

Daha önceki çalışmalar, beyin hasarı sonrası PAR-2 inhibisyonunun KBB geçirgenliğini azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini ve sonuç olarak nörolojik fonksiyonları iyileştirdiğini göstermiştir (9, 10, 28). Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu olarak, CBH sonrası erken dönemde (24 saat) PAR- inhibisyonunun SFCA'da BSI'de anlamlı azalma ve tüm



nörolojik testlerde anlamlı iyileşme ile ilişkili olduğunu gösterdi. Öte yandan daha uzun dönemde yani CBH sonrası 72. saatte PAR-2 inhibisyonu ile BSI'de azalma sağlandı, ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Benzer şekilde ayak hatası testindeki iyileşme istatistiksel fark yakalayamadı. Biz bu durumu hem uzun dönemde BSI'deki spontan rezorpsiyona hem de çalışmamızdaki hayvan sayısının istatistiksel açıdan fark yaratacak kadar yüksek olmamasına bağlıyoruz. Sonuçlarımız, PAR-2 inhibisyonunun CBH sonrasında artmış olan KBB geçirgenliği üzerindeki nöroprotektif etkisini ve bu etkinin nörolojik disfonksiyonu azaltıcı etkisini desteklemektedir.

Çalışmamızda saptanan sonuçlar diğer sıçan beyin hasarı modellerinde saptanan ve PAR-2 inhibisyonunun nöroprotektif etkinliğini savunan çalışmalara ait sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Örneğin, yakın dönemde sunulan bir çalışma, kardiyak arrest sonrası gelişen global iskemiye bağlı beyin hasarı sonrası beyinde PAR-2 seviyesinde artış ve buna bağlı gelişen beyin ödeminin göstergesi olarak albumin seviyelerinde artış, okludin ve klaudin-5 seviyelerinde azalma bildirmiştir. Aynı çalışma, PAR-2'nin aktivasyonunun KBB hasarına yol açtığını gösteren literatür bilgileri ile uyumlu olarak inhibisyonu halinde PAR-2'nin KBB üzerindeki koruyucu etkisinin okludin ve klaudin-5 seviyelerindeki artışa bağlı olduğunu göstermiş; bu durumu albumin seviyelerinde gösterilen azalma ile desteklemiştir (11).

Benzer şekilde, PAR-2 aktivasyonun mikroglia ve astrositler üzerinde aktivatör rol oynayarak nöroinflamasyonu tetiklediği gösterilmiştir (29-31). Örneğin, iskemik beyin hasarı sonrasında mast hücre kaynaklı triptaz salınımına yanıt olarak aktive olan PAR-2, hem in-vivo hem in-vitro çalışmalarda mikroglia ve astrosit aktivasyonu ile IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılamasında artışa neden olmuştur (12). Bununla uyumlu olarak sıçanlarda PAR-2 aktivasyonunun nöroinflamasyonu tetikleyerek nörolojik disfonksiyonda artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, mast hücre kaynaklı triptazın beyin hasarı sonrasında PAR-2'yi aktive ederek nörolojik disfonksiyona katkıda bulunduğunu desteklemektedir (9, 10, 28). Buna karşın beyin hasarı sonrasında aktive olan PAR-2'nin

iskemik koşullar altında astroglial aktivasyonu tetikleyerek nöroprotektif bir rolü olabileceğini öne süren çalışmalarda mevcuttur (32-34).

Çalışmamız, literatürde CBH sonrası PAR-2 ilişkili KBB hasarını gösteren ilk çalışmadır. CBH sonrasında, PAR-2 aktivasyonunun KBB hasarına katkısını göstermek amacı ile çalışmamızda selektif PAR-2 inhibitörü FSLLRY-NH2 i.n olarak uygulanmıştır. Benzer şekilde, hipotezimizi teyit etmek amacı ile PAR-2 aktivatörü AC55541'i i.n yolla uygulayarak artmış PAR-2 seviyesinin BSİ'deki artış ve nörodavranış testlerindeki bozulmayı daha da arttırdığını gösterdik. Benzer şekilde yaptığımız WB analizinde PAR-2 aktivasyonunun KBB hasarı ile korele olarak albumin seviyesinde artış ve sıkı bağlantı proteinleri olan okludin ve klaudin-5 seviyelerinde azalmaya yol açtığını ve PAR-2 inhibisyonu ile elde edilen KBB geçirgenliği üzerindeki nöroprotektif etkiyi tersine döndürdüğünü ortaya koyduk. Bu sonuçlar beyin hasarı sonrası PAR-2 inhibisyonunun KBB üzerindeki koruyucu etkisini öneren hipotezimizi desteklemektedir. Çalışmamızda WB yöntemi ile değerlendirilen endojen PAR-2 ekspresyonu, selektif PAR-2 inhibitörü FSLLRY-NH2'nin i.n uygulanması sonrası tedavi grubunda kontrol gruba göre anlamlı oranda azaldı. Öte yandan, aktive PAR-2'yi bloke etmek ve CBH sonrası PAR-2 aktivasyonunun kısmen de olsa KBB hasarından sorumlu olduğunu teyit etmek amacı ile i.n yolla uyguladığımız AC55541 ile PAR-2 ekspresyonunu anlamlı oranda arttıramadık. Bu durumun, PAR-2 aktivasyonu amacı ile kullanılan AC55541'in protein ekspresyonunu arttırmaktan ziyade fonksiyonel olarak PAR-2'yi potansiyelleştirerek ve mitojenle aktive olan protein kinaz fosforilasyonu ile mikrogliyalardan proinflamatuvar sitokin salınımını artırarak etki etmesine bağlı olduğunu düşündük (9, 28, 35).

Sonuç olarak, CBH sonrası görülen KBB hasarı ve buna bağlı gelişen beyin ödemi nörolojik disfonksiyona yol açmaktadır. Mast hücre triptazının endojen reseptörü olan PAR-2'nin inhibisyonu, CBH sonrası beyin ödeminde azalma ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ile ilişkilidir. Ayrıca CBH'yi takiben PAR-2 aktivasyonu, PAR-2 inhibisyonu ile sağlanan nöroprotektif etkiyi geri döndürmektedir. Bir başka deyişle sonuçlarımız, CBH sonrası mast hücre triptazına bağlı gelişen KBB hasarının en azından kısmen

PAR-2 aracılığıyla gerçekleştiğini desteklemektedir. Bu nedenle CBH sonrası PAR-2 inhibisyonunun KBB hasarını azaltmada yeni bir terapötik hedef olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Rolston JD, Han SJ, Lau C, Berger MS, Parsa AT. Frequency and predictors of complications in neurological surgery: national trends from 2006 to 2011. *J Neurosurg* 2014;120(3):736-45.
2. Wong JM, Panchmatia JR, Ziewacz JE, et al. Patterns in neurosurgical adverse events: intracranial neoplasm surgery. *Neurosurg Focus* 2012;33(5):E16.
3. Jadhav V, Solaroglu I, Obenaus A, Zhang JH. Neuroprotection against surgically induced brain injury. *Surg Neurol* 2007;67:15–2.
4. Ayer RE, Jafarian N, Chen W, et al. Preoperative mucosal tolerance to brain antigens and a neuroprotective immune response following surgical brain injury. *J Neurosurg* 2012;116(1): 246–53.
5. Dong H, Zhang X, Qian Y. Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014; 20:200-6.
6. Hyong A, Jadhav V, Lee S, et al. Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents. *Brain Res* 2008;1215:218–24.
7. Huang I, Tang H, Sherchan P, et al. The Activation of Phosphatidylserine/CD36/TGF- $\beta$ 1 Pathway prior to Surgical Brain Injury Attenuates Neuroinflammation in Rats, *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 4921562.
8. Manaenko A, Lekic T, Ma Q, Zhang JH, Tang J. Hydrogen inhalation ameliorated mast cell-mediated brain injury after intracerebral hemorrhage in mice. *Crit Care Med* 2013;41(5):1266-75.
9. Ocak U, Ocak PE, Huang L, et al. Inhibition of PAR-2 Attenuates Neuroinflammation and Improves Short-Term Neurocognitive Functions Via ERK1/2 Signaling Following Asphyxia-Induced Cardiac Arrest in Rats. *Shock* 2020;54(4):539-47.
10. Ocak U, Ocak PE, Huang L, Zhang JH. FSLRY-NH2 Improves Neurological Outcome After Cardiac Arrest in Rats. *Turk Neurosurg* 2020;30(2):244-51.
11. Zhou Q, Wang Y, Ni P, Chen Y, Dong H, Qian Y. Effect of tryptase on mouse brain microvascular endothelial cells via protease-activated receptor 2. *J Neuroinflammation* 2018;15: 248.
12. Zeng X, Zhang S, Xu L, Yang H, He S. Activation of Protease-Activated Receptor 2-Mediated Signaling by Mast Cell Tryptase Modulates Cytokine Production in Primary Cultured Astrocytes. *Mediators Inflamm* 2013;2013:140812.
13. Gan J, Greenwood SM, Cobb SR, Bushell TJ. Indirect modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus by activation of proteinase-activated receptor-2. *Br J Pharmacol* 2011;163(5):984-94.

14. Ritchie E, Saka M, Mackenzie C, et al. Cytokine upregulation of proteinase-activated-receptors 2 and 4 expression mediated by p38 MAP kinase and inhibitory kappa B kinase beta in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2007;150(8):1044-54.
15. Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(8):916-25.
16. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ, Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: Statistical validation. *Stroke* 1995;10.1161/01.
17. Zuo Y, Huang L, Enkhjargal B, Xu W, Umut O, Travis ZD, Zhang G, Tang J, Liu F, Zhang JH, Activation of retinoid X receptor by bexarotene attenuates neuroinflammation via PPAR $\gamma$ /SIRT6/ FoxO3a pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *J. Neuroinflammation* 2019;10.1186.
18. Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 1995;26(11):2135-44.
19. Ocak PE, Ocak U, Sherchan P, Gamdzyk M, Tang J, Zhang JH. Overexpression of Mfsd2a Attenuates Blood Brain Barrier Dysfunction via Cav-1/Keap-1/Nrf-2/HO-1 pathway in a rat model of surgical brain injury. *Exp Neurol* 2020;326:113203.
20. Lo W, Bravo T, Jadhav V, Titova E, Zhang JH, Tang J: NADPH oxidase inhibition improves neurological outcomes in surgically-induced brain injury. *Neurosci Lett* 2007;414:228–32.
21. Manninen PH, Raman SK, Boyle K, el-Beheiry H: Early postoperative complications following neurosurgical procedures. *Can J Anaesth* 1999;46:7–14.
22. Zakhary G, Sherchan P, Li Q, Tang J, Zhang JH. Modification of kynurenine pathway via inhibition of kynurenine hydroxylase attenuates surgical brain injury complications in a male rat model. *J. Neurosci* 2020;98(1):155-67.
23. Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, et al. Stepwise Recruitment of Transcellular and Paracellular Pathways Underlies Blood-Brain Barrier Breakdown in Stroke. *Neuron* 2014;82(3):603-17.
24. Yang WC, Wang Q, Chi LT, Wang YZ, Cao HL, Li WZ. Therapeutic hypercapnia reduces bloodbrain barrier damage possibly via protein kinase C $\epsilon$  in rats with lateral fluid percussion injury. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):36.
25. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84(2):579-621.
26. Niu Y, Zhao G, Li C, et al. Aspergillus fumigatus Increased PAR-2 Expression and Elevated Proinflammatory Cytokines Expression Through the Pathway of PAR-2/ERK1/2 in Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(1):166-75.
27. Ocak U, Ocak PE, Wang A, et al. Targeting mast cell as a neuroprotective strategy. *Brain Inj* 2019;33(6):723-33.

28. Ocak U, Ocak PE, Huang L, et al. Inhibition of mast cell tryptase attenuates neuroinflammation via PAR-2/p38/NFκB pathway following asphyxial cardiac arrest in rats. *J Neuroinflammation* 2020;17(1):144.
29. Rohatgi T, Sedehizade F, Reymann KG, Reiser G. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. *Neuroscientist* 2004;10(6):501-12.
30. Luo W, Wang Y, Hanck T, Stricker R, Reiser G. Jab1, a novel protease-activated receptor-2 (PAR-2)-interacting protein, is involved in PAR-2-induced activation of activator protein-1. *J Biol Chem* 2006;281(12):7927-36
31. Kempuraj D, Selvakumar GP, Thangavel R, et al. Glia maturation factor and mast cell-dependent expression of inflammatory mediators and proteinase activated receptor-2 in neuroinflammation. *J Alzheimers Dis* 2018;66(3):1117-29.
32. Hanusova Z, Mosko T, Matej R, Holada K. Precision in the design of an experimental study deflects the significance of proteinase-activated receptor 2 expression in scrapie-inoculated mice. *J Gen Virol* 2017;98(6):1563-19.
33. Jin G, Hayashi T, Kawagoe J, et al. Deficiency of PAR-2 gene increases acute focal ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(3):302-13.
34. Wan YJ, Xu L, Song WT, et al. The Ethanolic Extract of *Caesalpinia sappan* Heartwood Inhibits Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model Through a Multi-Targeted Pharmacological Mechanism. *Front Pharmacol* 2019;10:29.
35. White MJV, China LE, Pilling D, Gomer RH. Protease activated-receptor 2 is necessary for neutrophil chemorepulsion induced by trypsin, tryptase, or dipeptidyl peptidase IV. *J Leukoc Biol*. 2018;103(1):119-28.

## EK-1: KISALTMALAR

**BS:** Beyin Sapı

**BSİ:** Beyin Su İçeriği

**CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı

**F<sub>sağ</sub>:** Sağ Frontal

**F<sub>sol</sub>:** Sol Frontal

**i.n.:** intranazal

**KBB:** Kan Beyin Bariyeri

**mGS:** Modifiye Garcia Skoru

**PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2

**P<sub>sağ</sub>:** Sağ Parietal

**P<sub>sol</sub>:** Sol Parietal

**S:** Serebellum

**SBP:** Sıkı Bağlantı Proteinleri

**SF:** Serum Fizyolojik

**SFCA:** Sağ Frontal Cerrahi Alan

**SSS:** Santral Sinir Sistemi

**WB:** Western Blot

## EK-2: ŞEKİL, RESİM, TABLO VE GRAFİK AÇIKLAMALARI

**Şekil-1:** Bu çalışmada öne sürülen hipotezin şematik resmi. CBH takiben aktive olan mast hücrelerinden salınan triptaz PAR-2 aktivasyonuna sebep olur. CBH sonrası SBP ekspresyonundaki azalmaya bağlı beyin ödemi sonuç olarakta nörolojik disfonksiyon gelişmektedir. Bu çalışmada tedavi amacı ile PAR-2 inhibitörü (FSLRY-NH2) kullanılırken, hipotezde önerilen mekanizmanın teyidi için PAR-2 aktivatörü (AC55541) kullanılmıştır. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **SBP:** Sıkı Bağlantı Proteinleri.

**Şekil-2:** **A:** Hayvan pozisyonu, **B:** Orta hat insizyonu, **C:** Sağ frontal kraniotomi, **D:** CBH modelinin şematik şekli, **E:** Sham model örneği, **F:** CBH model örneği, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **SFCA:** Sağ Frontal Cerrahi Alanı.

**Şekil-3:** **A:** seyir dönemi, **B:** 24 saat son durum, **C:** 72 saat son durum, **D:** mekanizma çalışması, **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.

**Şekil-4:** CBH'ını takiben SFCA'da endojen triptaz ve PAR-2'nin geçici ekspresyonu. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

CBH'ını takiben SFCA'da endojen triptaz ve PAR-2 ekspresyonunun temsili WB görüntüsü (**A**), CBH'ını takiben SFCA'de endojen triptaz ekspresyonunun kantitatif analizi (**B**), CBH'ını takiben SFCA'da endojen PAR-2 ekspresyonunun kantitatif analizi (**C**). CBH takiben 6. saatte başlayıp 72. saate kadar giden triptaz (**B**) ve PAR-2 (**C**) değerlerinde artış saptandı.  $p < 0.05$  vs Sham,  $*p < 0.0001$  vs Sham. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **SFCA:** Sağ Frontal Cerrahi Alanı, **WB:** Western Blot.

**Şekil-5:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonunun BSİ ve nörodavranış testler üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

BSİ (**A**), mGS (**B**), denge kalası testi (**C**), sol ve toplam ayak hatası testi (**D**). CBH grubunda, Sham grubuna kıyasla BSİ'de artış ve tüm nörodavranış testlerde önemli ölçüde disfonksiyon saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte BSİ'de azalma ve nörodavranış testlerde iyileşme elde edildi.  $*p < 0.0001$  vs Sham,  $^{\wedge}p < 0.05$  vs CBH,  $\#p < 0.0001$  vs CBH. **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **BS:** Beyin Sıvısı, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>:** Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>:** Sol Frontal, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>:** Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>:** Sol Parietal, **S:** Serebellum.



**Şekil-6:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonunun BSİ ve KBB geçirgenliği üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (**A**), PAR-2 WB kantitatif analizi (**B**), albumin WB kantitatif analizi (**C**), okludin WB kantitatif analizi (**D**), klaudin-5 WB kantitatif analizi (**E**). CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde PAR-2 ve albumin (**B, C**) değerlerinde artış, PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte azalma saptandı. CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde okludin ve klaudin-5 (**D, E**) değerlerinde azalma, FSLRY-NH2 uygulamakla birlikte artış saptandı. \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, # $p < 0,0001$  vs CBH, & $p < 0.05$  vs Sham. **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB:** Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.

**Şekil-7:** CBH'ını takiben 72. saatte PAR-2 inhibisyonunun, BSİ ve nörolojik fonksiyonlar üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

BSİ (**A**), mGS (**B**), denge kalası testi (**C**), sol ve toplam ayak hatası testi (**D**). CBH grubunda Sham grubuna kıyasla BSİ'de artış ve tüm nörodavranış testlerde bozulma saptandı. PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte BSİ'de azalma ve nörodisfonksiyonda iyileşme elde edildi. & $p < 0.05$  vs Sham, \* $p < 0.0001$  vs Sham, ^ $P < 0.05$  vs CBH, **BSİ:** Beyin Su İçeriği, **BS:** Beyin Sapı, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>:** Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>:** Sol Frontal, **mGS:** Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>:** Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>:** Sol Parietal, **S:** Serebellum.

**Şekil-8:** PAR-2 inhibisyonunun CBH'ını takiben 72. saatte KBB geçirgenliği üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=4/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (**A**), PAR-2 WB kantitatif analizi (**B**), albumin WB kantitatif analizi (**C**), okludin WB kantitatif analizi (**D**), klaudin-5 WB kantitatif analizi (**E**). CBH takiben 72. saatte WB kantitatif analizinde PAR-2 ve albumin (**B, C**) değerlerinde artış, PAR-2 inhibisyonu uygulamakla birlikte azalma saptandı. CBH takiben 72. saatte WB kantitatif analizinde okludin ve klaudin-5 (**D, E**) değerlerinde azalma, PAR-2 inhibisyonu uygulaması ile birlikte artış saptandı. \* $p < 0.0001$  vs Sham, & $p < 0.05$  vs Sham, ^ $p < 0.05$  vs CBH, \* $p < 0.0001$  vs Sham, # $p < 0,0001$  vs CBH, **CBH:** Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB:** Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2:** Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB:** Western Blot.

**Şekil-9:** CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonu KBB hasarını azalttı. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

BSİ (**A**), mGS (**B**), denge kalası testi (**C**), sol ve toplam ayak hatası testi (**D**). AC55541 uygulanan grupta FSLRY-NH2 uygulanan gruba oranla BSİ'nde

artış ve tüm nörodavranış testlerde önemli ölçüde disfonksiyon saptandı. \*p<0.0001 vs Sham, ^p<0.05 vs CBH, #p<0.0001 vs CBH, \*\*\*P<0.0001 vs FSLLRY-NH2, \$p<0.05 vs FSLLRY-NH2. **BSİ**: Beyin Su İçeriği, **BS**: Beyin Sıvısı, **CBH**: Cerrahi Beyin Hasarı, **F<sub>sağ</sub>**: Sağ Frontal, **F<sub>sol</sub>**: Sol Frontal, **mGS**: Modifiye Garcia Skoru, **PAR-2**: Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **P<sub>sağ</sub>**: Sağ Parietal, **P<sub>sol</sub>**: Sol Parietal, **S**: Serebellum.

**Şekil-10**: CBH'ını takiben 24. saatte PAR-2 inhibisyonu WB yöntemi kullanılarak KBB hasarını azalttı. Veriler ortalama ± SD olarak ifade edildi. n=6/grup.

PAR-2, albumin, okludin, klaudin-5'i temsil eden WB bant analizi (**A**), PAR-2 WB kantitatif analizi (**B**), albumin WB kantitatif analizi (**C**), okludin WB kantitatif analizi (**D**), klaudin-5 WB kantitatif analizi (**E**). CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde AC55541 uygulamakla birlikte albumin (**C**) değerinde artış saptandı. CBH takiben 24. saatte WB kantitatif analizinde AC55541 uygulamakla birlikte klaudin-5 (**E**) değerinde azalma saptandı. PAR-2 ve okludin (**B**, **D**) değerlerinde anlamlı bir fark elde edilemedi. \*p<0.0001 vs Sham, ^p<0.05 vs CBH, #p<0,0001 vs CBH, \$p<0.05 vs FSLLRY-NH2, \*\*\*p<0.0001 vs FSLLRY-NH2, &p<0.05 vs Sham. **CBH**: Cerrahi Beyin Hasarı, **KBB**: Kan Beyin Bariyeri, **PAR-2**: Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB**: Western Blot.

**Tablo-1**: **BSİ**: Beyin Su İçeriği, **EE**: Ekarte edilen, **M**: Mortalite, **ND**: Nörodavranış, **Ort±SS**: Ortalama±Standart Sapma, **PAR-2**: Proteaz Aktive Edici Reseptör-2, **WB**: Western Blot, \*24 saat son durum ve mekanizma çalışmalarındaki BSİ değerlendirmesi için kullanılan denekler ortaktır. \*\*24 saat son durum ve mekanizma çalışmalarındaki WB değerlendirmesi için kullanılan denekler ortaktır. \*\*\*Çalışma için gereken denek sayısı 128 (ortak kullanım nedeniyle 92'e düştü. Ex olan ve yeterli lezyon oluşmaması nedeniyle çalışma dışı bırakılan denek grupları tamamlamak için eklenmiş ve çalışma toplamda 143 adet denek ile tamamlanmıştır).

**Grup 1**: Sham grubu.

**Grup 2a**: CBH+SF (kontrol) grubu.

**Grup 2b**: CBH+FSLLRY-NH2 (tedavi grubu).

**Grup 2c**: CBH+FSLLRY-NH2+AC55541 (mekanizma grubu).

**Tablo-2**: Modifiye Garcia Testi, **mGS**: Modifiye Garcia Skoru.

**Tablo-3**: Denge Kalası Test

## TEŞEKKÜR

Nöroşirürji eğitimim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve ihtisasım süresince her daim desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Bekar, Prof. Dr. Selçuk Yılmazlar, Prof. Dr. Şeref Doğan, Prof. Dr. Hasan Kocaeli, Prof. Dr. Mevlüt Özgür Taşkapılıoğlu ve Dr. Öğr. Üyesi Pınar Eser'e; örneklerin değerlendirilmesindeki yardımlarından ötürü Prof. Dr. Tülin Alkan ve Uzm. Dr. Birnur Aydın'a ekip olmanın önemini ve mutluluğunu hissettiren kıdemlilerim Uzm. Dr. Ömer Gökay Argadal'a, Uzm. Dr. İsmail Seçkin Kaya'ya, Uzm. Dr. Oğuz Altunyuva, Uzm. Dr. Rabia Nur Balçın'a, asistan arkadaşlarım Dr. Ali İmran Özmarasalı'ya, Dr. Reyhan Kasab'a, Dr. Parvin Valiyev'e, Dr. Hanside Setenay Ünal'a, Dr. Buket Sönmez'e, Dr. Fahrettin Yaqubov'a, Dr. Yağmur Tunçbilekli'ye ve Dr. Oğuzhan Eker'e; poliklinik, klinik, yoğun bakım ve ameliyathanemizde görev yapan hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her daim yanımda olan, ülkemiz ve insanlığa hayırlı ve de faydalı işler yapmamı tembihleyen ve bu yönde beni yetiştiren sevgili annem ve rahmetli babama; bana vizyon katan ve öncülük eden sevgili abim ve kardeşlerime, benim yoldaşım olan, burda geçirdiğim süreçte, icap ve nöbetlerimde sabır ve anlayışla beni bekleyen, her daim desteğini ve sevgisini hissettiğim sevgili eşim Rahaf'a kalpten teşekkürlerimle...

## ÖZGEÇMİŞ

14 Mart 1988 tarihinde Ürdün-Amman'da doğdum. İlk ve lise öğrenimimi Amman'da 2006 yılında tamamladım. Üniversite hazırlık sınavını bölge birincisi olarak tamamladığım için Türkiye'de burslu olarak Tıp Fakültesinde okuma hakkı kazandım. 2006 senesinde Türkiye'ye geldikten sonra 1 sene Ankara'da kalarak Türkçe Öğrenim Merkezi'nde (TÖMER) Türkçe eğitimimi tamamladım. Ardından Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde Tıp eğitimine başladım ve 2014 senesinde mezun oldum. Ürdün'e geri döndükten sonra denklik sınavını geçerek yaklaşık 2 yıl süre ile Amman'da çeşitli hastanelerde (devlet ve özel) pratisyen hekim olarak çalıştım. Türkiye'ye geri dönerek Tıpta Uzmanlık sınavını (TUS) geçtim ve 2017 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım.