



**RATLARDA İZOPROTERENOL
UYGULAMASIYLA OLUŞAN BEYİN
HASARINA KARŞI KARVAKROLÜN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Betül BAĞCI

Danışman: Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
2025
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**RATLARDA İZOPROTERENOL UYGULAMASIYLA OLUŞAN BEYİN HASARINA
KARŞI KARVAKROLÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of The Effects of Carvacrol on Brain Damage Induced by Isoproterenol
Administration in Rats)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül BAĞCI

Danışman: Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR

Erzurum
Haziran, 2025



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**Ratlarda İzoproterenol Uygulamasıyla Oluşan Beyin Hasarına Karşı Karvakrolün
Etkilerinin Araştırılması**

Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR danışmanlığında, Betül BAĞCI tarafından hazırlanan bu çalışma, 24/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç.Dr. Sefa KÜÇÜKLER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Başkanı:	Doç.Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN <i>Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr.Selim ÇOMAKLI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof..Dr.Ahmet ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../....
tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Aslı ıslak imzalıdır
Prof.Dr. Alper NUHOĞLU
Enstitü Müdürü

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Doç. Dr.Selçuk ÖZDEMİR* danışmanlığında sunulan “Ratlarda İzoproterenol Uygulamasıyla Oluşan Beyin Hasarına Karşı Karvakrolün Etkilerinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Metot	25	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	3	20
Sonuçlar ve Öneriler	3	20
Tezin Geneli	12	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının **%5’den** büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Betül BAĞCI	Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR
24.6.2025	24.6.2025
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) finansal desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma için danışmanlığımı üstlenen çalışmanın yürütülmesinden tezin yazım sürecine dek her türlü yardımını, bilgi ve deneyimini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde desteğini her zaman hissettiğim, benimle değerli bilgilerini paylaşan Sayın Arş. Gör. Şeyma AYDIN'a,

Benden samimiyetlerini, desteklerini, güzel sözlerini ve yardımlarını esirgemeyen, dostluklarını hep arayacağım çok değerli arkadaşlarım Hilal TOSUN'a, Habibe KARADAŞ'a, Ammar ALMANSOUR'a Beyzanur KAPLAN'a, ve İlknur KARADAYI'ya

Ayrıca, bu süreçte maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen BAĞCI ailesine ve ikinci ailem olan Atatürk Üniversitesi'ne,

İçtenlikle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Betül BAĞCI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RATLARDA İZOPROTERENOL UYGULAMASIYLA OLUŞAN BEYİN HASARINA KARŞI KARVAKROLÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Betül BAĞCI

Danışman: Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR

Amaç: Bu tez çalışması, sıçanlarda izoproterenol kaynaklı oksidatif stres, nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve beyin hasarı göstergelerine karşı güçlü, anti-inflamatuar, antioksidan, ve nöroprotektif aktiviteleri olduğu ileri sürülen karvakrol'ün koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamıştır.

Yöntem: Ratlar 5 gruba ayrıldı. Grup 1; Kontrol grubu, Grup 2; İzoproterenol grubu (subkutan uygulama), Grup 3 ; Karvakrol 50 mg/kg grubu (oral uygulama), Grup 4; İzoproterenol + Karvakrol 25 mg/kg (25 mg/kg dozunda oral yoldan karvakrol verildi. Seyreltilmiş izoproterenol 100 mg/kg subkutan uygulama), Grup 5; İzoproterenol + Karvakrol 50 mg/kg (50 mg/kg dozunda oral yoldan karvakrol verildi. Seyreltilmiş izoproterenol 100 mg/kg subkutan uygulama). Uygulama grupları hayvanlarından beyin dokusu ve serum örnekleri alındı. Alınan beyin dokularından biyokimyasal, histopatolojik, Western Blot, Real-Time PCR tekniğiyle karvakrolün nöroprotektif özellikleri değerlendirildi.

Bulgular: Karvakrol tedavisinin sağlıklı sıçanlarda bazal oksidatif stres düzeylerini değiştirmede, ancak antioksidan enzim aktivitesini artırarak, lipid peroksidasyonunu azaltarak ISO kaynaklı oksidatif hasarı hafiflettiğini, MDA düzeylerinde azalma sağladığını göstermiştir. Nöroinflamasyon açısından, ISO maruziyeti TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nf1 ve GFP gibi proinflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu artırarak güçlü bir inflamatuvar ve hasar yanıtını göstermiştir. CVC enjeksiyonu ise, bu belirteçlerin ekspresyonunu azalttı. Analiz, tüm gruplarda Abeta40, pTau181 ve tTau'nun ekspresyon düzeylerinde önemli değişiklik olmadığını göstermiştir. CVC ile tedavi edilen gruplarda NSE, s100B, CALP1 ve CALM1 gibi mitokondriyal hasar belirteçlerinin mRNA ekspresyonunun azalması, CVC'nin mitokondriyal disfonksiyonu hafiflettiğini göstermiştir. CVC, IL-1 β ekspresyonunu etkiledi ve nöroinflamatuvar göstergeleri azalttı, ancak beta-amiloid birikimini değiştirmede.

Sonuç: Bulgular, karvakrolün oksidatif stresi, inflamasyonu ve mitokondriyal bozukluğu hafifletmede nöroprotektif etkisinin olduğunu doğrulamıştır. Ancak, nörodejeneratif bozukluklardaki işlevini tamamen aydınlatmak için ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif Stres, Nöroinflamasyon, İzoproterenol (ISO), Karvakrol (CVC), Mitokondriyal Disfonksiyonu, Beyin Hasarı Belirteçleri

Haziran 2025, 60 sayfa

ABSTRACT
MASTER'S THESIS
INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CARVACROL ON BRAIN DAMAGE
INDUCED BY ISOPROTERENOL ADMINISTRATION IN RATS

Betül BAĞCI

Supervisor: Doç. Dr. Selçuk ÖZDEMİR

Purpose: This thesis study aimed to investigate the protective effects of carvacrol, which is suggested to have strong anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective activities against isoproterenol-induced oxidative stress, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction and brain damage indicators in rats.

Method: Rats were divided into five groups. Group 1; the Control group, Group 2; Isoproterenol group (subcutaneous administration), Group 3; Carvacrol 50 mg/kg group (oral administration), Group 4; Isoproterenol + Carvacrol 25 mg/kg (Carvacrol was given orally at a dose of 25 mg/kg. Diluted isoproterenol was given subcutaneously at 100 mg/kg), Group 5; Isoproterenol + Carvacrol 50 mg/kg (Carvacrol was given orally at a dose of 50 mg/kg. Diluted isoproterenol was given subcutaneously at 100 mg/kg). Brain tissue and serum samples were taken from the animals in the application groups. The neuroprotective properties of carvacrol were evaluated using biochemical, histopathological, Western Blot and Real-Time PCR techniques from the brain tissue samples.

Findings: It was indicated that carvacrol treatment did not change basal oxidative stress levels in healthy rats, but alleviated ISO-induced oxidative damage by increasing antioxidant enzyme activity, reducing lipid peroxidation, and providing a decrease in MDA levels. Concerning neuroinflammation, ISO exposure indicated a strong inflammatory and injury response by increasing the expression of proinflammatory markers such as TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nfl, and GFP. CVC injection reduced the expression of these markers. Analysis indicated that there were no significant changes in the expression levels of Abeta40, pTau181 and tTau in all groups. Decreased mRNA expression of mitochondrial damage markers such as NSE, s100B, CALP1, and CALM1 in CVC-treated groups indicated that CVC alleviated mitochondrial dysfunction. CVC affected IL-1 β expression and reduced neuroinflammatory markers, but did not alter beta-amyloid deposition.

Results: The findings confirmed the neuroprotective effect of carvacrol in alleviating oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction. However, additional investigation is necessary to completely clarify its function in neurodegenerative disorders.

Keywords: Oxidative Stress, Neuroinflammation, Isoproterenol (ISO), Carvacrol (CVC), Mitochondrial Dysfunction, Brain Damage Markers

June 2025, 60 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
GİRİŞ	1
Hipotez ve Amaç	3
KURAMSAL TEMELLER	4
İzoproterenol (ISO)	4
Hipoksik İskemik Ensefalopati (HIE)	5
Hipoksik İskemik Ensefalopati Patofizyolojisi	5
Nöronal Hasarın Mekanizması	6
Karvakrol	8
Karvakrolün Antioksidan Etkisi	9
Karvakrolün Nöroprotektif Etkisi	10
Oksidatif Stres	10
Antioksidanlar	11
Enzimatik Antioksidanlar.....	11
Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1).....	11
Katalaz (KAT, E.C.1.11.1.6)	11
Glutasyon Peroksidaz (GPx, E.C.1.11.1.9)	12
Non-enzimatik Antioksidanlar.....	12
Glutasyon (GSH).....	12
Beyin Hasarı Belirteçleri.....	12
Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α)	12
Nörofilament Hafif Zincir (Nf-L).....	13
Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP).....	13
Amiloid beta 40 (A β 40)	14
Nöron Spesifik Enolaz(NSE).....	14
S100B Proteinini	14

MATERYAL VE METOT	16
Materyal	16
Deney Hayvanları	16
Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
Analizler İçin Kullanılan Cihazlar ve Markaları	16
Metot	17
Deneyisel Uygulamalar	17
Numunelerin Alınması	17
Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi	18
Beyin Hasarıyla İlişkili Biyobelirteçlerin Değerlendirilmesi	18
ELISA Yöntemi İle A β 40, t-Tau ve pTau181 Protein Düzeylerinin Kantitatif Ölçümü ..	19
Gen Ekspresyon Analizleri	19
Total RNA İzolasyonu.....	19
cDNA Sentezi	20
Real Time PCR	20
Western Blot Analizleri.....	21
Histopatolojik İnceleme	21
İstatistiksel Analizler	22
BULGULAR	23
Karvakrolün Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri	23
Karvakrolün Nöroprotektif Etkileri.....	24
Nöroinflamasyon Belirteçlerinin Analizi.....	27
Karvakrolün Mitokondriyal Hasara Etkileri	28
Western Blot Bulguları	30
Histopatolojik Bulgular.....	31
TARTIŞMA.....	33
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar	16
Tablo 2. Primer Dizilimleri	20
Tablo 3. Serebral korteks ve hipokampal CA3'teki histopatolojik bulguların istatistiksel skorları	31



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.İzoproterenol yapısı.....	4
Şekil 2.Adrenalin ve isoproterenolün yapısal benzerliği.....	4
Şekil 3. Hipoksik iskemik ensefalopati patofizyolojisi	6
Şekil 4.Hipoksik İskemik Ensefalopati'de primer nöron hasarlanması evresi	7
Şekil 5.Karvakrolün kimyasal yapısı	8
Şekil 6.Çalışmanın tasarımı, deneysel iş akışı ve grup dağılımı	18
Şekil 7.Oksidatif stres belirteçlerinin analizi	24
Şekil 8.Beyin hasarı belirteçlerinin analizi.....	26
Şekil 9.Nöroinflamasyon Belirteçlerinin Analizi.....	27
Şekil 10.Mitokondriyal hasar belirteçlerinin analizi.....	29
Şekil 11.Beyin dokusu western blot görüntüsü	30
Şekil 12.Serebral Korteks ve Hipokampal CA3 Bölgesindeki Nöronal Hasarın Histolojik Analizi.....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ISO	:İzoproterenol
HİE	:Hipoksik-iskemik ensefalopati
ERS	:Endoplazmik retikulum stresi
OH⁻	:Hidroksil grup
CVC	:Karvakrol
NMDA	:N-metil D-aspartat
α	:Alfa
β	:Beta
γ	:Gamma
CaM	:Kalmodulin
Ca²⁺	:Kalsiyum
NO	:Nitrik Oksit
ROT	:Reaktif oksijen türleri
MSS	:Merkezi sinir sistemi
RNT	:Reaktif nitrojen türleri
OS	:Oksidatif stres
O₂⁻	:Süperoksit
RO₂	:Peroksil
HRO₂⁻	:Hidroperoksil
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
HOCl	:Hipoklorik asit
NO₂⁻	:Nitrojen dioksit
NO	:Nitrik oksit
HNO₂	:Nitröz oksit
ONOO	:Peroksinitrit
RONOO	:Peroksinitrat
SOR	:Serbest oksijen radikalleri
KAT	:Katalaz
SOD	:Süperoksit dismutaz
GPx	:Glutatyon peroksidaz

GSH	:Glutasyon
TNF-α	:Tümör Nekrozis Faktör-alfa
Nf-L	:Nörofilament Hafif Zincir
GFAP	:Glial Fibriler Asidik Protein
kDa	:Kilodalton
KBB	:Kan beyin bariyeri
Aβ	:Amiloid beta
Aβ40	:Amiloid beta 40
APP	:Amiloid prekürsör protein
NSE	:Nöron Spesifik Enolaz
BOS	:Beyin omurilik sıvısı
MDA	:Malondialdehit
IL-1β	:İnterlökin-1 beta
BDNF	:Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
ng	:Nanogram
pg	:Pikogram
μm	:Mikrometre
pTau-181	:Fosforile Tau 181
t-Tau	:Total Tau
TMB	:Tetrametilbenzidin
OD	:Optik yoğunluk
S100B	:S100 kalsiyum bağlayıcı protein B
CALB1	:Kalbindin
CALM1	:Kalmodulin
GAPDH	:Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HRP	:Horseradish peroksidaz
ECL	:Geliştirilmiş Kemilüminesans
WB	:Western Blot

GİRİŞ

Sentetik bir semptomimetik amin (katekolamin) olan izoproterenol (ISO) 1959 yılında keşfedilmiştir (Kahn *et al.*1969). İzoproterenol, bir tür beta-adrenerjik agonist ilaçtır. Beta-adrenerjik reseptörleri uyararak, vücutta birçok etkiye sahip bir hormon olan adrenalinin benzer etkilerini taklit eder. Adrenalin ile yapı olarak birbirine çok benzemektedir. Adrenalin vücutta doğal olarak sentezlenen bir katekolamindir ve adrenalin alfa reseptörlerini uyarır. İzoproterenol ise beta reseptörler üzerinde en güçlü agonist etki yapmasına rağmen alfa reseptör üzerine etkisi oldukça zayıftır. Bu seçici etki, izoproterenolün kalp atış hızının artması, bronkodilatasyon ve vazodilatasyon gibi belirli etkilerin ortaya çıkmasını sağlar. Bu özellikler, izoproterenolün bradikardi, astım ve solunum bozuklukları gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasında etkilidir. Adrenalin ile yapısal ve fizyolojik benzerlikleri nedeniyle izoproterenol, farmakolojik araştırmalarda ve yeni tedavi tekniklerinin formüle edilmesinde önemli bir araç olarak ortaya çıkmıştır (D'Ambrosi *et al.*2018).

İzoproterenol yüksek dozda verilirse miyokartta iskemiyi neden olmaktadır (Knufman, *et al.* 1987; Halıcı *et al.* 2006). Miyokarttaki iskemi, izoproterenolün kalp üzerindeki güçlü pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu etkiler, miyokardın oksijen ihtiyacını artırır, diyastolik dolma basıncını ve koroner perfüzyon basıncını düşürerek miyokartta iskemik değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, insanlarda gelişen kalp krizi sonrası değişimler ile benzerlik göstermektedir (Rona *et al.* 1959). Miyokard iskemisi uzun süre devam ederse, vücutta oksijen ihtiyacının azalmasına yol açabilir ve yetersiz oksijenlenme beyin hasarına neden olabilir. Ancak, uzun süreli miyokard iskemisi ile beyin üzerinde doğrudan etkileri arasındaki ilişki hakkında sınırlı bilgi vardır.

Hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE), hipoksi ve beyin kan akışının azalması sonucu oluşan, ölümle ve kalıcı nörolojik sonuçlarla sonuçlanan bir beyin hasarı türüdür (Dumbuya *et al.* 2021; Garci Alix *et al.* 2024). HİE'nin ortaya çıkışı, ilk hasardan sonraki saatler içinde nöronal hücre ölümüyle sonuçlanan ve devam eden bir süreçtir. Başlangıç evresinde iskemi ve hipoksi hücrel enerji tükenmesine neden olur, bu da oksidatif metabolik yetmezliğe, eksitotoksik kimyasalların birikmesine, hücre ölümüne, hücre içi Ca^{2+} aşırı yüklenmesine ve ödeme yol açar. Sonraki faz, vücudun solunum ve serebral dolaşımı yeniden başlattığı latent fazdır; ancak bu süreç reperfüzyon hasarı ve oksidatif stresle sonuçlanır. Bu dönemde nöroinflamasyon ve mitokondriyal işlev bozukluğu ortaya çıkar ve proapoptotik sinyal yolları aktive olur (Cánovas-Ahedo *et al.* 2019; Andelius *et al.* 2020; Ranjan *et al.* 2023). Bu durum,

gecikmiş nöronal ölüm olarak adlandırılan ikincil enerji yetersizliğine yol açar ve bu da hücre ölümünü, eksitotoksisiteyi ve oligodendrositlerin gecikmiş olgunlaşmasını şiddetlendirir. Kronik inflamasyon ve epigenetik değişiklikler, haftalarca, aylarca hatta yıllarca sürebilen kalıcı beyin hasarına yol açabilir ve sonuçta vücuda önemli zararlar verebilir. Hipoksik-iskemik ensefalopatinin (HİE) patogenezi öncelikle hipoksi-iskemi, reperfüzyon hasarı, inflamasyon, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite, ferroptozis, endoplazmik retikulum stresi (ERS), hücresel şişme, bozulmuş olgunlaşma ve apoptozis gibi mekanizmaları kapsar (Molloy *et al.*2024).

Bitki ürünleri ve türevleri, eski çağlardan beri tedavi edici unsurların kaynağı olarak kabul edilmektedir. Günümüzde ise, farklı bitki kaynaklarından elde edilen uçucu yağlar ve ekstraktları potansiyel antioksidan bileşikler olarak araştırılmaktadır. Bunlardan biri olan kekik eski zamanlardan beri hem baharat hem de ilaç olarak kullanılan çok önemli bir bitkidir. Karvakrol (CVC) ise, ilk olarak kekik ve sonrasında diğer aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan monoterprenik (Temel yapısı birbirine bağlı iki izopren biriminden oluşan, bitkilerde ve uçucu yağlarında yaygın olarak bulunan bir dizi kimyasaldır) bir fenoldür (Gandova *et al.* 2023; Mączka *et al.* 2023; Chaachouay *et al.* 2024). Karvakrol (CVC),günümüzde sıklıkla ve yüksek oranda gıda ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Karvakrol'un antifungal, antibakteriyel ve antioksidan etkileri yapılan birçok çalışmada gözlemlenmiştir (Friedman, 2014; Sharifi-Rad *et al.* 2018;Imran *et al.*2022). Bunların yanı sıra, karvakrol'un birçok yararlı etkileri vardır. Bunlar; antimutajenik, antigenotoksik, antispazmodik, angiyojenik, antiparazitik, insektisidal, antihepatoksik etkilerdir (Baser *et al.* 2008; Gündüz, 2010). Karvakrol (CVC), pek çok faydalı etkisinin yanı sıra rejenerasyonu başlatan özelliklere de sahiptir (Uyanoglu *et al.* 2008). Tüm bunların yanı sıra karvakrolün antioksidan özelliğini destekleyen birçok çalışma da bulunmaktadır.Karvakrol (CVC), kimyasal yapısında bir hidroksil grubuna (OH-) sahip olduğu için bir antioksidan olarak kabul edilir (Kulisic *et al.* 2004). Kekğin,antioksidan özellikleri ve kimyasal bileşikleri arasındaki ilişki incelendiğinde, antioksidan gücünün antioksidan konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmektedir (Gündüz, 2010).Yapılan çalışmalar, karvakrolün farelerde ve sıçanlarda nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Friedman, 2014). Karvakrolün nöroprotektif potansiyeli araştırılmış olup, lipid peroksidasyon düzeylerini ve hücre ölümünü azalttığı görülmüştür (Guan *et al.* 2019).

S100B proteini, düşük molekül ağırlıklı (9–13 kD) kalsiyum bağlayıcı S100 proteinlerinden oluşan multigenik ailenin bir parçasıdır. S100B ağırlıklı olarak merkezi sinir sisteminin glial hücrelerinde, özellikle astrositlerde bulunur (Donato, 1986;Heizmann *et*

al.2002). Enolazlar, üç farklı immünolojik alt birimden (α , β ve γ zincirleri) oluşan dimerik izoenzim dizisi olarak adlandırılan glikolitik enzimlerdir. γ γ ve α γ izoformları nöronlar, periferik nöroendokrin doku ve amin öncül alım ve yıkım sistemiyle ilişkili malignitelerle sınırlıdır (Cooper, 1994). Kalmodulin (CaM), kalsiyum sinyallemesinin önemli bir bölümünü ileten çok yönlü bir kalsiyum iyon sensör proteinidir. CaM, her biri bir çift EF-el kalsiyum bağlayıcı motif içeren ve uzunlamasına esnek bir merkezi sarmal ile birbirine bağlanan, yapısal olarak benzer iki küresel alana sahip halter biçimli bir proteindir (Ikura *et al.*2006).

Yapılan araştırmalara göre farklı nedenlerden kaynaklı beyin hasarı oluşturulmuş ve beyin hasarına karşı karvakrolün etkileri incelenmiştir. Ancak çalışmaları incelediğimizde izoproterenolün hipoksiye bağlı beyin hasarı oluşturup oluşturmadığı sorusunun cevabını alabileceğimiz çalışma bulunmamaktadır.

Hipotez ve Amaç

Yapacağımız çalışma sonucunda elde edilmesi öngörülen bulgular;

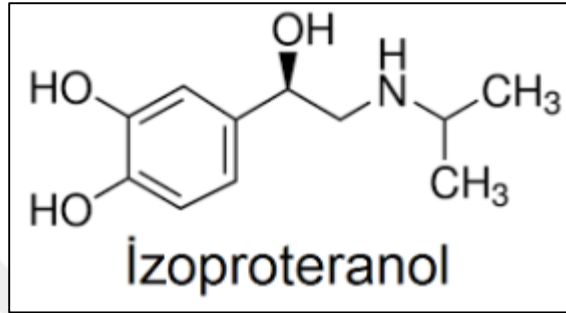
- Sıçanlarda izoproterenol uygulamasının neden olduğu beyin hasarının boyutunu karakterize etmek ve nöronal hasarın altında yatan mekanizmaları aydınlatmak,
- CVC'nin, ISO'nun neden olduğu nöronal hasarı hafifletmedeki potansiyel terapötik etkilerini incelemek ve beyindeki oksidatif stresi, inflamasyonu ve hücrel hasarı önleme yeteneğini değerlendirmek,

Sonuç olarak, bu tez kapsamında güçlü, anti-inflamatuar, antioksidan, ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olan karvakrolün izoproterenol kaynaklı beyindeki hasara karşı potansiyel koruyucu etkisinin belirlenmesi ve bu doğrultuda, ISO tarafından antioksidan savunma sistem unsurlarının seviyelerinde oluşabilecek değişimler, oksidatif stres, nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve hücrel hasar üzerine karvakrol etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

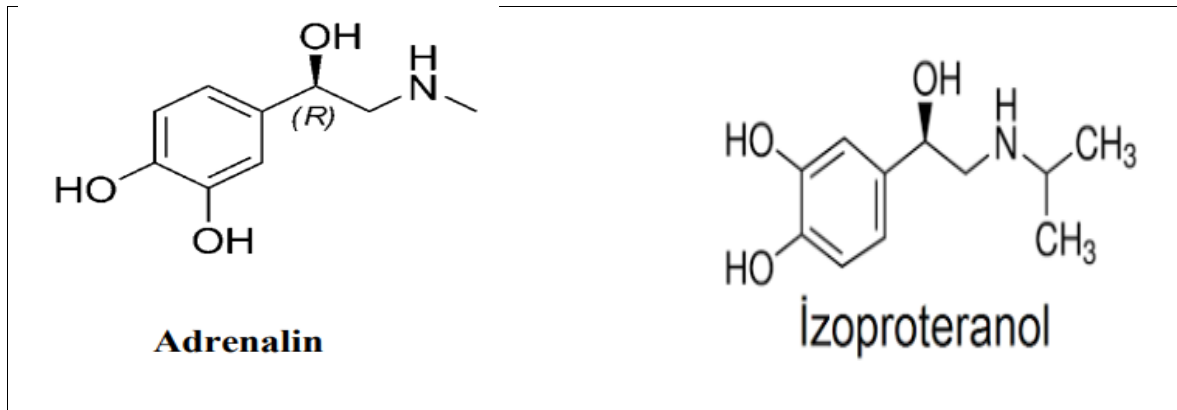
İzoproterenol (ISO)

Sentetik bir semptomimetik amin (katekolamin) olan izoproterenol (ISO) 1959 yılında keşfedilmiştir (Kahn et al.,1969). Beta-adrenerjik reseptörlere etki eden en güçlü yapıdaki semptomimetik ilaçtır (Özgün, 2013). İzoproterenolün sistemik ismi 4-(1- hidroksi-2-[(metiletil)amino]etil)-1,2-benzendiol hidroklorittir ve kapalı formülü $C_{11}H_{17}NO_3.HCl$ 'dir. Molekül ağırlığı ise 247.72 g'dır (Oğlakçı, 2016) (**Şekil 1**).



Şekil 1.İzoproterenol yapısı (Oğlakçı, 2016)

İzoproterenol beta-adrenerjik reseptörleri uyararak, vücutta birçok etkiye sahip bir hormon olan adrenalinin benzer etkilerini taklit eder. Adrenalin ile yapı olarak birbirine çok benzemektedir (**Şekil 2**). Adrenalin vücutta doğal olarak sentezlenen bir katekolamindir ve adrenalin alfa reseptörlerini uyarır. İzoproterenol ise beta reseptörler üzerinde en güçlü agonist etki yapmasına rağmen alfa reseptör üzerine etkisi oldukça zayıftır (D'Ambrosi *et al.* 2018).



Şekil 2.Adrenalin ve isoproterenolün yapısal benzerliği (D'Ambrosi *et al.* 2018).

İzoproterenol (ISO) vazodilatör etkiye sahiptir. Ağız yoluyla alınamaz çünkü adrenalin gibi izoproterenol de bağırsakta inaktive edilir. ISO, bronkospazm ve solunum problemlerini tedavi etmek ve astım atağı sırasında bronkodilatör olarak kullanılır. Ayrıca belirli kalp rahatsızlıklarını tedavi etmek, özellikle de bradikardi durumunda kalp atış hızını artırmak için

kullanılmaktadır (D'Ambrosi *et al.* 2018; Ogata *et al.* 2020). İzoproterenol (ISO) kalbin çalışmasını doğrudan hızlandırmakla kalmaz, dolaylı olarak da kan basıncını düşürerek kalbin çalışmasını hızlandırır. Bu da kalbin oksijen tüketimini artırır ve verimini düşürür (Kayalp, 2012). Kalbin oksijen ihtiyacı karşılanamadığında ise göreceli hipoksi oluşur. Yüksek dozda verilen izoproterenol ise miyokartta iskemi durumuna neden olur (Knufman *et al.* 1987). Uzun süreli miyokard iskemisi, vücudun oksijen ihtiyacının azalmasına neden olabilir ve bu durum yetersiz oksijenlenmeye yol açarak beyin hasarına sebep olabilir.

Hipoksik İskemik Ensefalopati (HİE)

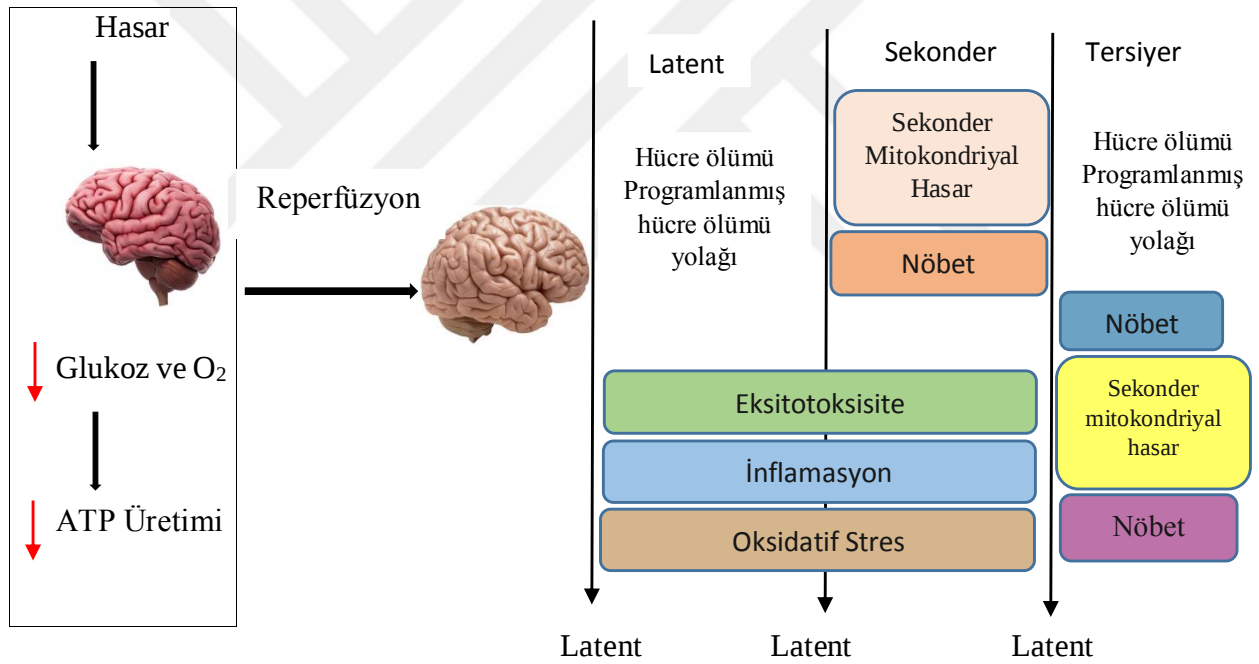
Hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE), beyine yetersiz kan ve oksijen gitmesi sonucu oluşan, başta merkezi sinir sistemi olmak üzere, birçok organda çeşitli derecelerde işlev bozukluğuna yol açabilen klinik bir durumdur (Dumbuya *et al.* 2021). Oksijen yetersizliğinde hipoksinin şiddetine göre tüm organlar etkilenirken, etkilenen organlar arasında en hassas olanı beyindir. Oksijensizlik nedeniyle beyinde meydana gelen olaylar, hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) olarak tanımlanır. HİE, antepartum dönemde %50, intrapartum dönemde %40 ve postpartum dönemde ise %10 oranında görülmektedir (Lai *et al.* 2011).

Hipoksik-iskemik ensefalopati, nörolojik bozuklukların, neonatal beyin hasarının morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir (Akar *et al.* 2017). Hipoksik iskemik durum, akut ya da kronik olarak gelişebilir ve genellikle çeşitli maternal, kord, plasental ve uterus gibi faktörlerle ilişkilidir. Ayrıca, postnatal dönemdeki şok, solunum veya kalp durması gibi olaylar da hipoksik-iskemik hasara yol açabilir (Garci Alix *et al.* 2024). Tıp alanındaki ve teknolojiadaki ilerlemelere rağmen, günümüzde nörolojik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir.

Hipoksik İskemik Ensefalopati Patofizyolojisi

Hipoksik iskemik ensefalopati patofizyolojisinde mitokondriyal enerji üretim yetmezliği, oksidatif stres, glutaminerjik eksitotoksiste ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Fetusa yeterli oksijen ve glukoz sağlanmadığında, oksidatif fosforilasyon bozulur ve hücreler anaerobik metabolizmaya geçiş yapar. Anaerobik metabolizma sonucunda laktik asidoz meydana gelir ve bu durum daha sonra fetal asidemiye yol açar (Douglas-Escobar *et al.* 2015). Asfiksi, serebral iskemiyeye yol açar ve bu durum hücresel yüksek enerjili fosfat düzeylerinde ani bir düşüşe neden olur. Bu olay, primer enerji yetersizliği olarak tanımlanmaktadır. Hücre yüzeyindeki enerji bağımlı iyon kanalları, özellikle Na-K-ATPaz ve Na-Ca pompaları, işlevlerini kaybettiğinde hücre içerisine su, sodyum ve klor girmeye başlar. Bu durum, hücrenin şişmesine ve osmotik lizise yol açar. Hücresel depolarizasyon nedeniyle

glutamat salınımı artar. N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin glutamat ile aşırı uyarılması, hücre içindeki kalsiyum seviyesinin yükselmesine yol açar ve bu durum, nekrotik hücre ölümüne sebep olur(Greco *et al.* 2020). Ayrıca, serbest oksijen radikallerinin artışı, nitrik oksit üretimini ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu tetikler. Bu durum, hücre zarında hasara yol açarak apoptozda rol oynayan genlerin, özellikle Caspase-3, uyarılmasına neden olmaktadır. Akut zedelenme ve resüsitasyonun ardından serebral kan akımı kısmen veya tamamen düzelmeye başlar. Bu döneme "latent faz" denir ve 6-15 saat sürer. Latent faz süresince oksidatif metabolizma normale dönerken, ikincil inflamasyon ve hücrel apoptoz süreçleri de başlamaktadır. Müdahale edilmediği takdirde, latent faz ikincil enerji yetersizliğine dönüşebilir; bu da hücrel eksitotoksisite, oksidatif hasar ve üç gün içinde nöronal ölüme yol açar. Nöbetler genellikle ikinci aşamada meydana gelir (Douglas-Escobar *et al.* 2015; Greco *et al.* 2020). Hipoksik iskemik ensefalopatinin patofizyolojisi **Şekil 3**'de gösterilmiştir.

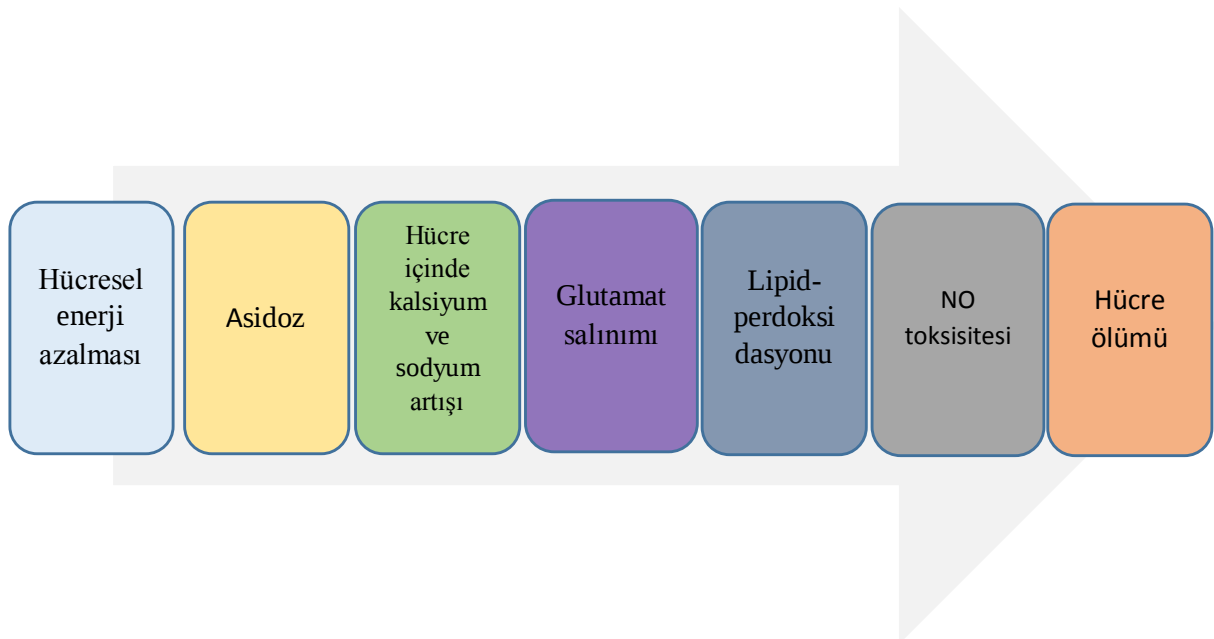


Şekil 3. Hipoksik iskemik ensefalopati patofizyolojisi (Douglas-Escobar *et al.* 2015'ten düzenlenmiştir).

Nöronal Hasarın Mekanizması

Hipoksik iskemik ensefalopati sırasında meydana gelen nöron hasarı, akut hasarın başlangıcından reperfüzyon dönemine kadar süregelen bir süreçtir (Lai *et al.* 2011). Merkezi sinir sistemi, glukoz ve oksijene büyük ölçüde ihtiyaç duyan bir yapıdır. Hipoksik iskemik ensefalopati sırasında meydana gelen nörolojik hasar, hem oksijenin hem de yetersiz kan

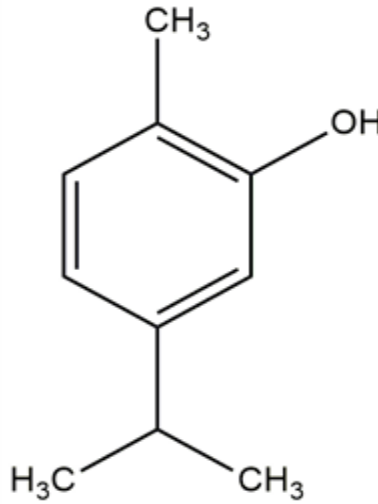
akışının neden olduğu oksijen ve glukoz eksikliğinden kaynaklanan enerji yetersizliğini beraberinde getirir. Bu durum, hücre disfonksiyonu ve hücre ölümüne yol açan bir dizi biyokimyasal reaksiyonun tetiklenmesine neden olur (Lai *et al.* 2011; Volpe, 2012). Beyin normal şartlarda enerjisini mitokondrilerde gerçekleşen aerobik metabolizma aracılığıyla sağlar. Tüketilen her bir molekül glukoz, 38 molekül ATP'nin oluşumunu sağlar. Bu metabolik sürecin gerçekleşebilmesi için 3,3 ml/100g/dakika kadar oksijen desteğine ihtiyaç duyulmaktadır. Oksijen ve glukoz kaynaklarının azalması durumunda primer ve sekonder enerji eksikliği meydana gelir (Lai *et al.* 2011). Primer enerji eksikliği durumunda, yetersiz oksijen nedeniyle beyin glukozu aerobik olarak metabolize edemez. Bu durumda ketonlar ve diğer substratlardan da yararlanamaz ve bu nedenle anaerobik metabolizma yoluna yönelir. Bu yöntemle ise yalnızca iki molekül ATP üretimi gerçekleşir ve yan ürün olarak laktik asit ortaya çıkar. Laktik asit birikimi sonucunda pH seviyeleri giderek düşer ve bu durum dokuda asidoza yol açar (Volpe, 2012). Yeterli ATP sentezlenemediğinde, ATP bağımlı Na-K pompası işlevini yerine getiremez. Bu durum, hücre içinde Na⁺, Ca²⁺ ve suyun birikmesine, glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınımına, fosfolipaz aktivitesinin artmasına ve serbest radikallerin oluşumuna yol açar (Tan *et al.* 1998; Lai *et al.* 2011; Volpe, 2012). (Şekil 4) Geçmişte reaktif oksijen radikallerinin doku hasarına yol açtığı düşünülürdü; artık, oksidan ve antioksidanların karşılıklı etkileşimleri sonucunda da doku hasarının meydana geldiği anlaşılmaktadır (Tan *et al.* 1999).



Şekil 4. Hipoksik İskemik Ensefalopati'de primer nöron hasarlanması evresi (Tan *et al.* 1998; Lai *et al.* 2011; Volpe, 2012'den düzenlenmiştir).

Karvakrol

Karvakrol (CVC), *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Corydorthymus* gibi çeşitli aromatik bitki türlerinin uçucu yağlarında bulunan, ayrıca sentez yoluyla elde edilebilen fenolik ve bir oksijenli monoterpendir (Baser, 2008). IUPAC adı 5-izopropil-2-metilfenoldür. Moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dur (Vincenzi *et al.* 2004). **Şekil 5**'te karvakrolün kimsayal yapısı gösterilmiştir. CVC, suda çözünmez ancak eter ve alkolde çözünmektedir. Kaynama noktası 237-238°C, erime noktası 1.0°C ve pH'ı 3.9'dur. Karvakrol (CVC), oldukça küçük ve lipofilik bir yapıya sahip olduğu için hücre membranını kolaylıkla geçebilmektedir. Karvakrol, Lamiaceae familyasından olan kekik ve güveyotu gibi tıbbi aromatik bitkilerin uçucu yağ fraksiyonunun başlıca doğal bileşenidir (Zotti *et al.* 2013).



Şekil 5.Karvakrolün kimyasal yapısı (Zhang *et al.*2018)

Karvakrol'ün antifungal, antibakteriyel ve antioksidan etkileri yapılan birçok çalışmada gözlemlenmiştir (Friedman, 2014;Sharifi-Rad *et al.* 2018; Imran *et al.* 2022). Bunların yanı sıra, karvakrol'ün birçok yararlı etkileri vardır. Bunlar; antimutajenik, antigenotoksik, antispazmodik, angiyojenik, antiparazitik, insektisidal, antihepatoksik etkilerdir (Baser *et al.* 2008; Gündüz, 2010). Karvakrolün, hem gram negatif hem de pozitif bakterilere karşı kapsamlı ve güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Solomakos *et al.* 2008). Karvakrol (CVC) bakteriyel hücre zarlarına nüfuz ederek hücre içerisinde antimikrobiyal aktivite gösterir (Cristani *et al.* 2007). Ayrıca antikanserojen bir bileşik olarak da işlev görür. Bu özellikleri sayesinde, gıda katkı maddelerinden kozmetik ürünlere kadar pek çok alanda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Friedman, 2014).

Yapılan birçok çalışma, karvakrolün analjezik, antiinflamatuvar, yara iyileştirme ve hücre proliferasyonunu arttırıcı etkilere de sahip olduğunu göstermiştir. Bazı deneysel çalışmalar ise, karvakrolün hasar görmüş karaciğer hücrelerinin yenilenme sürecini hızlandırdığını göstermiştir (Canbek *et al.* 2008) ayrıca akciğer kanserinde de iyileştirici gücünün olduğu ispatlanmıştır (Koparal *et al.* 2003).

Karvakrol (CVC), pek çok faydalı etkisinin yanı sıra rejenerasyonu başlatan özelliklere de sahiptir (Uyanoglu *et al.* 2008). Tüm bunların yanı sıra karvakrolün antioksidan özelliğini destekleyen birçok çalışma da bulunmaktadır. Karvakrol, kimyasal yapısında bir hidroksil grubuna (OH-) sahip olduğu için bir antioksidan olarak kabul edilir (Kulisic *et al.* 2004). Kekğin, antioksidan özellikleri ile kimyasal bileşikleri arasındaki ilişki incelendiğinde, antioksidan gücünün antioksidan konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmektedir (Gündüz, 2010).

Yapılan çalışmalar, karvakrolün farelerde ve sıçanlarda nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Friedman, 2014). Ayrıca, Guan ve arkadaşları tarafından karvakrolün nöroprotektif rolü incelenmiş ve karvakrolün, lipid peroksit seviyelerini ve hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Guan *et al.* 2019).

Karvakrolün Antioksidan Etkisi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) meydana gelmesi ile bu süreçleri engelleyen antioksidan moleküller ve enzimler arasındaki dengesizlikten oluşmaktadır (Samarghandian *et al.* 2015). Artış gösteren metabolik hız, ek serbest radikallerin oluşumuna neden olmakta ve bu durum, reaktif oksijen türleri ile antioksidan sistem arasında bir dengesizlik yaratmaktadır. Bu serbest radikaller, hücrelerde bulunan proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküllerde oksidatif hasara yol açmaktadır (Jomova *et al.* 2023). Yapılan çalışmalarda, oksidatif stres süreci devam ederken doğal antioksidan takviyeleri almanın vücuttaki organ fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (Gupta *et al.* 2010). Karvakrolün ise güçlü bir antioksidan etkisi vardır (Javed *et al.* 2023). Karvakrolün antimikrobiyal ve antioksidan etkileri üzerinde, özellikle aromatik halka ile bağlantılı olan OH-grubunun önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Kulisic *et al.* 2004). Karvakrolün radikal süpürücü etkisi reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırıp GSH seviyelerini korur. Bu şekilde, karvakrol tedavisi GSH seviyesinin artışına yol açmaktadır. Ayrıca, hücre kültürü ve hayvan deney çalışmaları da CVC'nin genel antioksidan kapasitesini arttırdığını göstermiştir (Aeschbach *et al.* 1994).

Karvakrolün Nöroprotektif Etkisi

Yapılan araştırmalar nöroinflamasyon ve oksidatif stresin merkezi sinir sistemi (MSS) bozukluklarında önemli rol oynadığını, öğrenme ile hafıza bozukluklarının en önemli nedenlerinden biri olduğunu ortaya koymuştur.

Önceki araştırmalarda ise, inflamatuvar sitokinlerin sürekli üretiminin hafızayı, glutamat salınımını ve hücre sinyal yollarını etkilediği ortaya konmuştur (Galic *et al.* 2012). Düşük molekül ağırlığı ve lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini aşarak nöroprotektif etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Lee *et al.* 2020). Karvakrolün, 6-hidroksidopaminle tetiklenen Parkinson hastalığı hayvan modelinde (Haddadi *et al.* 2018), diabetik sıçanlarda (Deng *et al.* 2013) ve epileptik sıçanlarda (Khalil *et al.* 2017) antioksidan etkileri sayesinde nöroprotektif özellikleri olduğu kanıtlanmıştır. Son dönemlerdeki araştırmalarsa, karvakrolün nörodejeneratif hastalıklara karşı etkili bir antioksidan olduğunu ortaya koymaktadır (Azizi *et al.* 2022). Ayrıca, karvakrolün kaspaz-3'ü inhibe ederek nöronal apoptozu hafiflettiği de gösterilmiştir (Dati *et al.* 2017).

Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidan yönde bozulması sonucunda ortaya çıkar. OS, doğal bir süreçtir ve bu süreci kontrol altında tutan özel mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda ise oksidatif hasar meydana gelir (Sies, 2020). Oksidatif streste önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri arasında serbest radikaller olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2) ve hidroperoksil (HRO_2^-) gibi bileşenler ile birlikte, nonradikal türler olarak da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit (HOCl) bulunmaktadır. RNT ise, nitrojen dioksit (NO_2^-) ve nitrik oksit (NO) gibi serbest radikaller ile nitroz oksit (HNO_2), peroksinitrit (ONOO), ve alkil peroksinitrat (RONOO) gibi nonradikal bileşenleri içermektedir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) veya RNT'nin oluşumu, radikal zincir reaksiyonları sayesinde diğer ürünlerin üretilmesine neden olmaktadır (Sies, 2020). Serbest radikallerin yaşam süreleri çok uzun olmamakla birlikte proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle etkileşime girerek hücresel yapı ve işlevlerde bazı değişikliklere neden olabilirler (Rohansen *et al.* 2005).

Birçok hastalığın etiyopatogenezi açısından reaktif oksijen türlerinin artışı ve lipid peroksidasyonu önemli bir rol oynamaktadır. Lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türleriyle meydana gelen hücre hasarının en önemli sonuçlarından biridir. Normal metabolizma sırasında

düşük hızda gerçekleşen lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve oksidanların fazlalığıyla artış göstermektedir (Sies, 2020). Aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimi, hücre fonksiyon kaybına yol açar ve bu da apoptoz veya nekroz ile sonuçlanır (Rohansen *et al* 2005).

Antioksidanlar

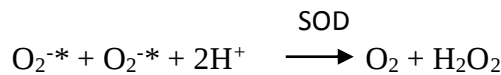
"Antioksidanlar" vücutta reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyen, bu maddelerin yol açtığı hasarı engelleyen ve detoksifikasyonu sağlayan maddelerdir (Karabulut *et al.* 2016). İnsanda bulunan antioksidanların bir kısmı ya vücut tarafından doğal olarak kendisi üretir ya da dışarıdan ek olarak alınır. Antioksidanlar, kaynaklarına göre endojen (enzimatik ve nonenzimatik) ve eksojen olmak üzere iki gruba ayrılır (Gulcin, 2020).

Enzimatik Antioksidanlar

Serbest radikallere karşı ilk savunma hattını vücutta üretilen katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik antioksidanlar oluşturur (Ighodaro *et al.* 2018).

Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

SOD, substrat olarak serbest radikalleri kullanan tek antioksidan enzimdir. SOD, bir süperoksit radikalini $O_2^{\cdot -}$ ye oksitleyip diğer bir süperoksit radikalini de daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder (Aslankoç *et al.* 2019).



Süperoksit Dismutaz'ın üç farklı izoformu vardır. Bunlar, sitozolde bulunan bakır (Cu-SOD) ve çinko (Zn-SOD) formları ile mitokondride bulunan ve mangan içeren (Mn-SOD) izoformudur (Aslankoç *et al.* 2019).

Katalaz (KAT, E.C.1.11.1.6)

Yapısında tek bir ferriprotoporfirin barındıran ve her bir alt birimin enzimin kararlılığında önemli bir rol üstlendiği NADPH içeren bir hemoproteindir (Aslankoç *et al.* 2019).

Memeli hücrelerinin mitokondrilerde bulunmaz. Ancak bu durumun tek bir istisnası vardır; o da sıçan kalbinde bulunan mitokondridir. Katalaz, reaktif oksijen türlerine karşı

biyolojik sistemi koruyabilen, indüklenabilir bir enzimdir. Bu enzimin temel foksiyonu H_2O_2 'yi moleküler oksijen ve suya katalizlemektir (Aslankoç *et al.* 2019).



Glutasyon Peroksidaz (GPx, E.C.1.11.1.9)

Çoğu zaman aktivitesi selenyuma bağlı olan glutasyon peroksidaz mitokondri ve bazen de sitozolde hidrojen peroksidi suya dönüştüren önemli bir antioksidandır. GPx'in en önemli işlevi, oksidatif strese karşı hücreleri korumaktır. Tanımlanan en az 8 adet GPx enzimi (GPx1-GPx-8) vardır (Aslankoç *et al.* 2019).

GPx, önemli bir hidrojen peroksit indirgeyici enzim olup, hücreleri çeşitli hasarlara karşı korumada görevlidir (Sharma *et al.* 2008). Araştırmalar, düşük GPx seviyelerinin antioksidan sistemin bozulmasına yol açtığını göstermektedir. Bu durum, membran yağ asitleri ve fonksiyonel proteinlerde oksidatif hasar oluşumuna neden olmakta; sonuç olarak nörotoksik hasar gelişimi ve nörodejenerasyon ile birlikte kalıcı hasarlar ortaya çıkmaktadır. Tüm bu bulgular, antioksidan savunma sisteminin bozulduğunu göstermektedir (Aslankoç *et al.* 2019).

Non-enzimatik Antioksidanlar

Glutasyon (GSH)

Glutasyon, hücrelerdeki en önemli antioksidan moleküldür ve nonenzimatik bir antioksidandır. Reaktif oksijen türlerinin düzenlenmesinde çok önemlidir. Özellikle karaciğer olmak üzere birçok dokuda bulunan glutasyon, serbest radikallerle ve peroksitlerle etkileşime girerek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Ayrıca, bazı enzimler için substrat veya kofaktör olarak kullanılır (Jefferies *et al.* 2003).

Beyin Hasarı Belirteçleri

Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α)

Tnf- α , başlıca monositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen, çeşitli hücre ve dokularda mitoz, farklılaşma, bağışıklık düzenlemeleri, anjiyogenez, ve iltihap süreçleri gibi pek çok önemli işlevde görev alan bir sitokindir (Vilcek, 2008). Doku hasarı veya fiziksel stres sonrasında kanda ilk tespit edilen sitokindir, ayrıca birçok otoimmün hastalıkta inflamasyonun başlaması ve sürdürülmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. TNF- α , nöroinflamasyon sürecinin çok erken aşamalarında salınarak, travmatik beyin hasarında diğer sitokinlere kıyasla konsantrasyon artışları bakımından daha belirgin bir artış göstermektedir. Merkezi sinir

sisteminde TNF- α 'nın başlıca kaynakları genellikle mikrogialar ve astrositlerdir. Ayrıca inme, beyin içi kanama, siyatik sinir ve omurilik yaralanması gibi bazı patolojik durumların nöronlarda TNF- α sentezini indüklediği gösterilmiştir (Chen *et al.* 2016).

Nörofilament Hafif Zincir (Nf-L)

Nörofilamentler, özellikle aksonlarda bol miktarda bulunan nöronların hücre iskeleti proteinleridir ve nöronların yapısal bütünlüğünü korumak için oldukça önemlidirler (Varhaug *et al.* 2019). Nörofilament hafif zincir ise (Nf-L), yapısal proteinlerin en hafif zinciri olup nöron liflerinin uzunluğunu ve dayanıklılığını destekler. Nf-L, nörofilamentlerin omurgasını oluşturur ayrıca en çözünür ve en bol alt birim olduğundan, biyolojik sıvılardaki seviyelerinin güvenilir bir şekilde ölçülmesini mümkün kılar (Poesen *et al.* 2017). Normal fizyolojik koşullar altında aksonlardan az miktarda Nf-L salınır ve bunun ileri yaşlarda arttığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, nörodejeneratif, inflamatuvar, travmatik veya vasküler yaralanma nedeniyle merkezi sinir sistemi (MSS) aksonal hasarına yanıt olarak Nf-L salınımı belirgin bir şekilde artar. Hayvan çalışmalarında, Nf-L seviyeleri yıllardır aksonal hasarın bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Karlsson *et al.* 1991). Sonuç olarak, Nf-L nörolojik araştırmalarda ve klinik çalışmalarda nörodejeneratif hastalıkların tanısı ve ilerlemesinin izlenmesi için kullanılan önemli bir biyobelirteçtir, çünkü bu tür hastalıklarda, nöronlar zarar gördüğünde veya dejenerasyona uğradığında, nörofilamentlerin parçaları kanda serbest hâle gelir ve bu nedenle nörofilament hafif zincir (Nf-L) düzeylerinin ölçümü, nörolojik hasarın derecesini değerlendirmek için önemli bir yoldur (Deisenhammer *et al.* 2009)

Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)

1969 yılında Dr. Eng tarafından izole ve karakterize edilen glial fibriler asidik protein astroglial (astrosit) hücrelerin yapısında bulunan 50 kDa ağırlığında intrasellüler tip III ara filament proteinidir (Eng *et al.* 2000). Merkezi sinir sistemi dışında bulunmaz. GFAP, astrositlerin mekanik gücünü korumak ayrıca komşu nöronları ve kan beyin bariyerini (KBB) desteklemek gibi merkezi sinir sisteminde çok sayıda önemli fonksiyona hizmet eden proteindir. Bu protein rutin olarak kanda salgılanmaz ancak hücre ölümü veya hasarı sonrasında salınır. Bu yüzden travmatik beyin hasarında ideal bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Lumpkins *et al.* 2008). Yapılan çalışmalarda, akut, travmatik ve serebrovasküler hasarlarda GFAP'ın beyin omurilik sıvısı konsantrasyonlarında artış olduğu bildirilmiştir (Gomi *et al.* 1995).

Amiloid beta 40 (A β 40)

Amiloid beta(A β), senil plakların önemli bir bileşenidir ve nöronlar, glial hücreler, astrositler ve beyin endoteli üzerinde birçok toksik etki gösterir (Askarova *et al.* 2011). Amiloid beta(A β) 40 veya 42 amino asitten oluşan ve 21. kromozomda kodlanan daha büyük bir transmembran protein olan amiloid prekürsör proteininin (APP) sırasıyla; β - ve γ -sekretaz enzimleri tarafından kesilmesiyle oluşur. Yani A β , amiloid prekürsör proteininin(APP) metabolizma ürünlerindendir (Guo *et al.* 2021). Normalde amiloid betanın %90'ı A β 40 formundayken %5'ten azı A β 42 formundadır. Bu, A β 40'ın beyinde A β 42'den daha fazla olduğu anlamına gelir. Amiloid betanın fizyolojik rolü hala kesin olarak bilinmemektedir ancak A β 42 olarak bilinen uzun formu, Alzheimer hastalığının patolojik plaklarının oluşumunda önemlidir. A β 42, nöronlarda birikerek toksik oligomerlerin ve amiloid plaklarının oluşumuna katkıda bulunabilir. Bu plaklar, sinir hücreleri arasındaki iletişimi bozabilir ve nöronal hasara yol açar (Sun *et al.* 2015). Amiloid beta 40 (A β 40) ve amiloid beta 42 (A β 42), özellikle Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların teşhisi ve değerlendirmesinde önemli biyobelirteç olarak kullanılabilirler. Bu belirteçler, hastalığın varlığını, şiddetini ve ilerleyişini izlemek amacıyla çeşitli tıbbi testler ve araştırmalarda kullanılır (Wang *et al.* 2020).

Nöron Spesifik Enolaz(NSE)

NSE, merkezi sinir sisteminde glukoz metabolizmasında rol oynayan stoplazmik bir glikolitik enzim olan enolazın dimerik izoenzimidir. Enolazın üç immünolojik alt birimi bulunur (α , β , γ). Dokularda en yaygın bulunan α izoenzimidir. Sitotoksik bileşenlere maruz kalan nöronlarda NSE salınımının olduğu, daha önce gerçekleştirilen in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, artan NSE düzeylerinin ölen nöronal hücre sayısını belirlemede iyi bir gösterge olarak kabul edildiği de belirtilmiştir. Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da, iskemik ve travmatik beyin hasarlarında NSE düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (Kamtchum-Tatuene *et al.* 2019).

S100B Proteinini

S100 ailesinin bir üyesi olan S100B proteini astrositler tarafından sentezlenen hücre içi bir glikoproteindir. S100B proteini hücre içinde Ca $^{2+}$ reseptörü gibi, dışında da nöropeptit gibi etki gösterir. Beyindeki S100 proteinlerinin %96'sını S100B oluşturmaktadır (Donato *et al.* 2009).

S100B proteininin glial hücreye özgü olduğu ve primer astrositlerde ifade edildiği öne sürülmektedir. Bu proteinin hücreler arası iletişim, hücre içi sinyal iletimi, enerji metabolizması,

nöron uzaması, kalsiyum akışının uyarılması, protein kinaz C aracılı fosforilasyonun inhibisyonu, astrositozis ve aksonal proliferasyon gibi birçok önemli süreçte rol oynadığı düşünülmektedir (Donato *et al.*2009). S100B proteinleri, beyin hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu hücrelerden salınarak kanda tespit edilebilir hale gelmektedir. Beyin hasarlarında ve nörodejeneratif hastalıklarda, bu proteinler astrositlerin aktivasyonunu tetikler. Glial ve Schwann hücrelerinde bir hasar oluştuğunda ise, S100B proteinleri beyin omurilik sıvısına (BOS) ve kana salınır. Ayrıca, proliferasyon gösteren astrositlerden de bu proteinler salınabilir (Zimmer *et al.* 2005).

S100B proteini sağlıklı bireylerin kanında oldukça düşük seviyelerde tespit edilebilmektedir. Beyinde meydana gelen yaralanmalar sonucunda ise, bu protein beyin dokusundan BOS'a, ardından da seçici bir şekilde kana geçiş yapar. Bu durum, kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin arttığını göstermektedir. S100-B proteini, MSS bozuklukları için son derece yüksek özgüllük ve duyarlılık göstermektedir. Ayrıca, travma ve inme gibi durumlarla ilişkili olarak serum konsantrasyonlarının arttığına dair yayınlar mevcuttur (Ettinger *et al.* 1999).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram, 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) temin edildi. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca, 12:12 s aydınlık/karanlık döngü, 24±20 °C sabit sıcaklık ve %40-80 nem değerine sahip olan bir ortamda barındırıldı. Deney öncesinde ratlar bir hafta boyunca kafeslerinde tutularak bulundukları ortama adapte edildi. Bu süreçte hayvanların yem veya suya ad libitum olarak erişimleri sağlandı. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

İzoproterenol: CAS Numarası: 7683-59-2, Saflık %98 ile tercih edildi.

Karvakrol: CAS Numarası: 499-75-2, Saflık %98 ile tercih edildi.

Analizler İçin Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Analizde kullanılan cihazlar **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1.Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Hassas Ölçüm Terazisi	Shimadzu ATX224
Real Time	Qiagen Rotor Gene Q
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001
Buzdolabı	Bosch
Homojenizatör	Tissuelyser II, Qiagen
Otomatik Pipetler	Brand transferpette®
Saf Su Cihazı	GFL 2001/2
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 38 R
ELISA Reader	Bio-Tek
Vorteks	Ika MS-2
Western Blot	Thermo Scientific
Ultra Derin Dondurucu (-80)	Thermo
Spektrofotometre	Biotech Epoch

Metot

Deneysel Uygulamalar

Çalışma her bir grupta Sprague Dawley cinsi 7 adet erkek rat bulunan 5 farklı gruptan oluşmaktadır.

Gruplar şu şekilde dizayn edilmiştir;

1.Grup: Kontrol: Ratlara 14 gün boyunca oral yoldan distile su verildi.

2.Grup: İzoproterenol (ISO): Ratlara iki gün boyunca (13. Gün ve 14. Gün) 24 saat aralıklarla tuzlu su içinde çözülmüş izoproterenol (100 mg/kg) deri altından (subkutan) uygulandı (Kumar et al. 2017).

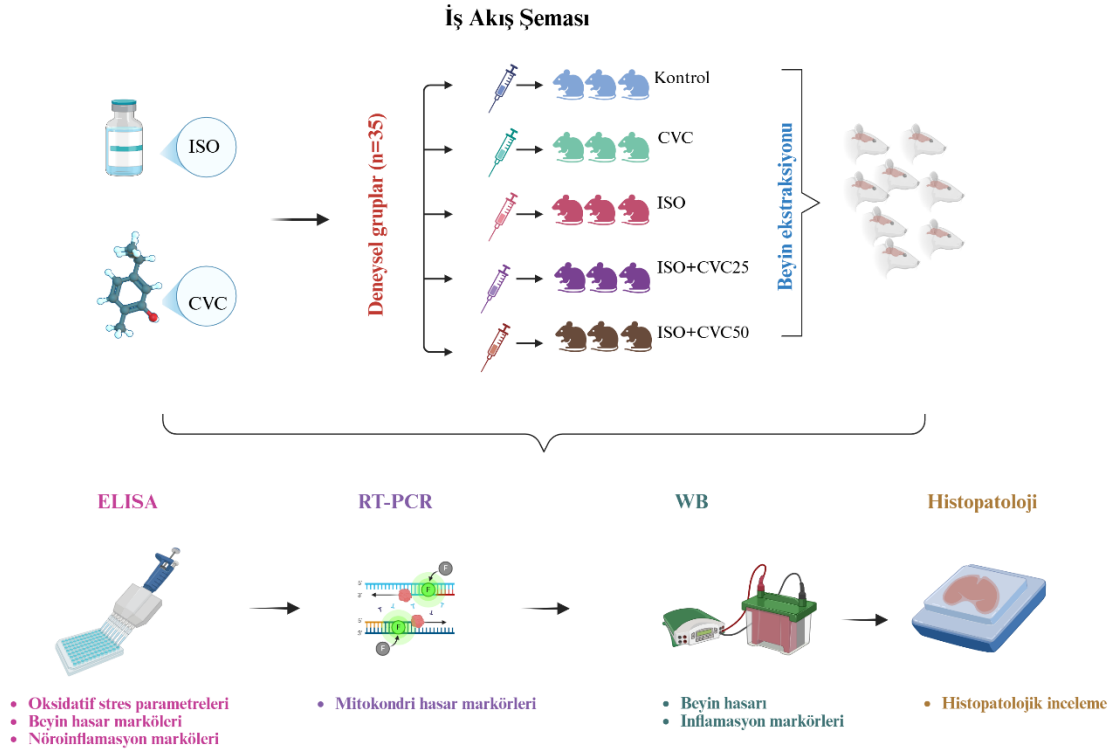
3.Grup: Karvakrol 50 mg/kg:Ratlara, 14 gün boyunca 50 mg/kg dozunda karvakrol oral olarak uygulandı (Kandemir *et al.* 2021).

4.Grup: İzoproterenol+Karvakrol 25 mg/kg: Ratlara, 14 gün boyunca 25 mg/kg dozunda oral yoldan karvakrol verildi. Son iki gün (13. Gün ve 14. Gün) 24 saat ara ile tuzlu su içinde çözülmüş izoproterenol (100 mg/kg) deri altından (subkutan) uygulandı.

5.Grup: İzoproterenol+Karvakrol 50 mg/kg:Ratlara, 14 gün boyunca 50 mg/kg dozunda oral yoldan karvakrol verildi. Son iki gün (13. Gün ve 14. Gün) 24 saat ara ile tuzlu su içinde çözülmüş izoproterenol (100 mg/kg) deri altından (subkutan) uygulandı.

Numunelerin Alınması

Ratlar, son ISO ve CVC uygulamalarından sonra, sevofloran anestezisi ile yeterli sedatif etki oluşunca dekapite edildi. Beyin dokuları alınarak biyokimyasal analizler için -80 °C’de saklandı. Kanlar antikoagölansız vakumlu tüplere alındıktan sonra 3000 devirde +4 °C’de 10 dk. santrifüj edildi ve serum örnekleri elde edildi edildi. Alınan beyin dokuları biyokimyasal, RT-PCR, Western Blot, ELISA analizleri için derin dondurucuda, patolojik incelemeler için ise %10’luk tamponlu formaldehitte muhafaza edildi. Çalışmanın tasarımı, deneysel iş akışı ve grup dağılımı ayrıntılı olarak **Şekil 6**’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Çalışmanın tasarımı, deneysel iş akışı ve grup dağılımı

Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi

Sıçanların beyinlerinde, ELISA yöntemi kullanılarak antioksidan enzimlerin; süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ile glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Her parametre için özel ELISA kitleri kullanıldı: Sıçan SOD ELISA Kiti (Kat No: MBS036924, Tespit Aralığı: 12,5 U/ml - 400 U/ml), Sıçan KAT ELISA Kiti (Kat No: MBS2600683, Tespit Aralığı: 1,56 ng/ml - 100 ng/ml), Sıçan GSH ELISA Kiti (Kat No: MBS9712516, Tespit Aralığı: 50 ng/L - 800 ng/L), Sıçan GPx ELISA Kiti (Kat No: MBS744364, Tespit Aralığı: 0 ng/mL - 25 ng/mL), ve Sıçan MDA ELISA Kiti (Kat No: MBS727531, Tespit Aralığı: 0 ng/mL - 100 ng/mL). ELISA ölçümleri kit talimatlarında belirtilen özel protokoller izlenerek gerçekleştirildi.

Beyin Hasarıyla İlişkili Biyobelirteçlerin Değerlendirilmesi

İzoproterenol'un neden olduğu beyin hasarı, ELISA yöntemi ile TNF- α , IL-1 β , GFAP, Nf-L, BDNF ve c-Fos gibi çeşitli biyobelirteçlerin ölçülmesiyle değerlendirildi. Nöroinflamasyon, nöronal hasar ve nöronal aktivite ile ilişkileri nedeniyle bu belirteçler seçildi. Her bir biyobelirteç için özel ELISA kitleri kullanılarak beyin dokusu örneklerindeki miktarları üretici firmanın yönergelerine uygun olarak ölçüldü. Sıçan TNF- α ELISA Kiti, (Katalog No:

MBS282960, Tespit Aralığı: 6,25 pg/mL - 400 pg/mL), Sıçan IL-1 β ELISA Kiti (Katalog No: MBS265868, Tespit Aralığı: 15,6 pg/mL- 1000 pg/mL), Sıçan c-Fos ELISA Kiti, (Katalog No: MBS729725, Tespit Aralığı: 0 ng/mL-10 ng/mL), Sıçan BDNF ELISA Kiti (Katalog No: MBS355345, Tespit Aralığı: 31,2 pg/ml-2000 pg/ml), Sıçan Nf-L ELISA Kiti (Katalog No: MBS9399608, Tespit Aralığı: 3.12ng/ml-100ng/ml), Sıçan GFAP ELISA Kiti, (Katalog No: MBS2505953, Tespit Aralığı: 0,31 ng/mL-20 ng/mL). ELISA ölçümleri kit talimatlarında belirtilen özel protokoller izlenerek gerçekleştirildi.

ELISA Yöntemi İle A β 40, t-Tau ve pTau181 Protein Düzeylerinin Kantitatif Ölçümü

Ticari ELISA kitleri kullanılarak amiloid beta 40 (A β 40), total Tau (t-Tau) ve pTau181 protein konsantrasyonları kantitatif olarak değerlendirildi. Beyin örnekleri homojenize edilerek -80°C'de muhafaza edildi ve daha sonra incelendi. Her örnek, standartlar ve diğer örneklerle birlikte ELISA plakalarına konuldu ve ardından 2 saatlik inkübasyon süresi uygulandı. Daha sonra yıkama işlemi yapılarak sekonder antikor/enzim konjugatları eklendi ve bir saat inkübe edildi. Reaksiyon TMB substratı ile başlatıldı ve sonlandırma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı. Optik yoğunluk (OD) değerleri 450 nm'de ölçüldü ve protein konsantrasyonları standart eğri kullanılarak belirlendi. Sıçan A β 40 ELISA Kiti (Katalog No: MBS727047, Tespit aralığı: 0 pg/mL-500 pg/mL), Sıçan t-Tau ELISA Kiti (Katalog No: MBS1600235 Tespit Aralığı: 5ng/L - 1800ng/L), Sıçan pTau-181 ELISA Kiti (Katalog No: MBS9905658, Tespit Aralığı: 6,25pg/ml-200pg/ml).

Gen Ekspresyon Analizleri

Total RNA İzolasyonu

Deney gruplarından alınan doku örneklerinin (50 mg), üzerine 1 ml TRIzol-LS (Qiazol, Qiagen, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edildi ve 12.000 x g 4°C de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernetant yeni bir ependorfa alınıp üzerine 500 μ l kloroform eklendi, çözelti 1 dakika boyunca vortekslendi ve daha sonra 12.000 x g 4°C de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernetant tekrar yeni bir ependorfa alınıp üzerine 200 μ l izopropanol eklendi ve 12.000 x g 4°C de 10 dk. santrifüj edildi. Daha sonra süpernetant atılıp pelet üzerine 500 μ l 75%'lik etanol eklendi ve 7.500 x g 4°C de 10 dk. santrifüj edildi. Son olarak etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA peleti uygun hacimde RNA parçalayıcı enzim olmayan (RNase free ve DEPC bulunan) su ile çözüldü. Elde edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu, bir spektrometre kullanılarak 260-280 nm'de absorbans ölçümleri ile belirlendi. 260 nm absorbansa göre miktarı belirlenmiş RNA'nın 1 μ g'ı 1.5%'lik agaroz jele yüklenerek RNA'nın bütünlüğü ve miktarı kontrol edildi.

cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinde DNA kontaminasyonuna karşı DNase I (Thermo Scientific) kullanıldı. Uygulama üründe verilen protokole göre yapıldı. Daha sonra bu RNA'ların 2-5 µg'ı miScript Reverse Transcription Kiti (Qiagen) kullanılarak verilen protokole uygun şekilde cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve konsantrasyonu, bir spektrofotometre ile 260-280 nm absorbans ölçümleri ile belirlendi ve aynı oranlarda seyreltilti. Daha sonra Real Time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edildi.

Real Time PCR

Nöron Spesifik Enolaz (NSE), S100 kalsiyum bağlayıcı protein B (S100B), Kalbindin (CALB1), Kalmodulin (CALM1), genlerinin mRNA transkript seviyelerini ölçmek için Qiagen Rotor Gene HRM-5 cihazı kullanılarak RT-PCR gerçekleştirildi. İnternal kontrol olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanıldı. Real time PCR deneylerinde oluşturulan master mix içeriği; Syber Green 2X Rox Dye Master mix (Qiagen), genler için tasarlanmış forward ve reverse primerler, template olarak cDNA'lar ve nükleaz free sudan oluşuyordu. Kullanılan primerler **Tablo 2.** gösterilmiştir. Master mixler hazırlandıktan sonra örnekler 3'lü tekrar olacak şekilde Real Time cihazında analiz edildi ve elde edilen Ct/Cq değerleri 2-DeltaDeltaCt metoduna uygun olarak hesaplanarak ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi (Livak *et al.*2001).

Tablo 2. Primer Dizilimleri

Gen	Sekanslar (5'-3')	Uzunluk (bp)	Erişim No
NSE	F: GGGCACTCTACCAGGACTTT R: CAAACAGTTGCAGGCCTTCT	191	AF019973.1
S100B	F: CAGGGAGAGAGGGTGACAAG R: AACTCATGACAGGCTGTGGT	208	BC087026.1
CALP1	F: ATCCACCTGCAGTCATCTC R: CCCATCATCTCTCTGCCCAT	205	XM_032905553.1
CALM1	F: TGATAAAGATGGGGACGGCA R: GCCATTGCCATCCTTGTC AA	238	AF178845.1
GAPDH	F: AACGACCCCTTCATTGACCT R: CCCCATTTGATGTTAGCGGG	164	NM_017008.4

Western Blot Analizleri

Deney gruplarından beyin dokusu alındı, sıvı nitrojen içerisinde hızla donduruldu ve -80°C'de saklandı. Doku örnekleri buz üzerinde tutulurken, 1x RIPA tamponu eklenerek uygun bir doku homojenizatörü (örn. Tissue Lyser) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon sırasında proteaz inhibitörü kombinasyonu ve fosfataz inhibitörü gibi proteaz ve fosfataz inhibitörlerinin kullanılması gereklidir. Homojenize edilmiş örnekler, hücre kalıntılarını izole etmek amacıyla 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, protein çözeltisi olarak kullanıldı. Protein konsantrasyonu Bradford veya BCA (Bisinkoninik Asit) tayin yöntemi kullanılarak belirlendi ve eşit protein miktarlarının sağlanması için örnekler standardize edildi. Laemmli tampon yöntemi kullanılarak %10-12'lik poliakrilamid jel hazırlandı. Yirmi ila kırk mikrogram protein numune tamponuyla birleştirilerek jele yüklendi. Yükleme işlemi her numune için iki veya üç kez yapıldı. Protein örnekleri, ayrıştırılması amacıyla 1-1,5 saat süreyle 120-150 V voltaja tabi tutuldu. Proteinler nitroselüloz membranlara aktarıldı. Transfer buz üzerinde 100V'da 1-1,5 saat süreyle gerçekleştirildi. Membran, %5 yağsız süt (veya gerekirse %5 BSA) ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Amiloid Beta Antikoru: Amiloid Beta 1-42 veya 1-40 antikoru uygun şekilde seyreltilerek (tipik olarak 1:1000-1:5000) membrana uygulandı ve 4°C'de bir gece inkübe edildi. IL-1 Beta antikoru 1:1000 ile 1:5000 arasında seyreltildi ve 4°C'de bir gece inkübe edildi. Membran, TBS-T (0,1% Tween 20 içeren Tris tamponlu tuzlu su) kullanılarak her biri 10 dakika süren üç yıkamaya tabi tutuldu. Genellikle 1:5000-1:10000 seyreltme oranında uyumlu HRP konjuge sekonder antikor uygulandı ve kullanılan birincil antikora bağlı olarak ortam sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Membran, her biri 10 dakika süren TBS-T ile üç kez yıkandı. Protein tespiti için geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) geliştirme kiti kullanıldı. Membran hazırlanan solüsyonla birleştirilerek ışık emisyonunu ölçen kemilüminesans görüntüleyici kullanılarak incelendi.

Histopatolojik İnceleme

Çalışma sonunda ratlar hafif sevofluoran anestezisi altında ötenazi edildi, hayvanlara ait beyin dokuları alındı ve bir kısmı fiksasyona olanak sağlamak amacıyla 72 saat boyunca %10 formaldehit solüsyonunda saklandı. Fiksasyondan sonra, kesilmiş dokular doku kasetlerine yerleştirildi ve kalan formaldehiti uzaklaştırmak için akan musluk suyu altında yıkandı. Dokular daha sonra, artan alkol konsantrasyonları ile kademeli dehidratasyon, ksilen ile temizleme ve otomatik gömme makinesi kullanılarak parafine gömme gibi rutin histolojik prosedürler uygulandı. Parafin bloklardan mikrotom (RM2255, Leica) kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin-eozin ile boyandı. Boyama protokolü şu şekildeydi: Doku

kesitleri 57 °C’de 1 saat inkübe edilerek deparafinize edildi, ardından ksilen I ve ksilen II solüsyonlarında 5’er dakika bekletildi.Rehidrasyon, kesitlerin giderek azalan alkol konsantrasyonlarında (%100, %96, %90, %80, %70 ve %50) 3'er dakika bekletilmesi ve ardından 5 dakika distile suda bekletilmesiyle gerçekleştirildi.Kesitler hematoksilin solüsyonuna 2 dakika daldırıldı ve distile su ile 1 dakika yıkandı.Eozin boyama, kesitlerin 10-30 saniye süreyle eozin solüsyonuna daldırılmasıyla gerçekleştirildi.Dehidratasyon, %95 alkol (iki kez) ve %100 alkol (iki kez) kullanılarak her biri 30 saniye olacak şekilde gerçekleştirildi. Alkol, ksilen kullanılarak (iki kez) uzaklaştırıldı.Kesitlere bir-iki damla Entellan damlatılıp üzerleri lamel ile kapatıldı.Hazırlanan kesitler ışık mikroskobunda (Leica DM750, Flexacam i5 kamera) incelendi.Histopatolojik değerlendirme için kortikal ve hipokampal bölgelerin farklı alanları 40x objektif lens altında incelendi.Puanlama, aşağıdaki ölçütler kullanılarak gözlemlenen bulgulara göre gerçekleştirildi: [0] Histopatolojik bulgu yok, [1] Hafif bulgular [2] Orta bulgular [3] Şiddetli bulgular.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler hem R programlama dili hem de GraphPad yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.Tüm şekillerin oluşturulmasında GraphPad yazılımı kullanıldı; bu sayede deneysel verilerin açık ve kesin bir şekilde tasvir edilmesi garanti altına alındı.Verilerin dağılımını değerlendirmek ve parametrik ya da parametrik olmayan bir dağılıma uyup uymadığını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı.Test bulguları, verilerin parametrik test için gerekli varsayımları karşılamadığını, dolayısıyla parametrik olmayan bir dağılıma işaret ettiğini göstermiştir.

Grup farklılıklarını karşılaştırmak için Dunn'ın post hoc testinin ardından Kruskal-Wallis testi kullanıldı.Kruskal-Wallis testi, verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda çok sayıda bağımsız grup arasındaki farklılıkları incelemek için uygun, parametrik olmayan bir tekniktir.Kruskal Wallis sonuçlarının anlamlı olmasından sonra belirli grup farklılıklarını tespit etmek için post-hoc analiz olarak Dunn testi kullanıldı.Bu yöntem, hem ELISA hem de RT-PCR çalışmalarından elde edilen ölçümlerin parametrik olmayan özelliklerini de dikkate alarak, titiz istatistiksel analiz ve sonuçların kesin yorumlanmasını garanti eder.

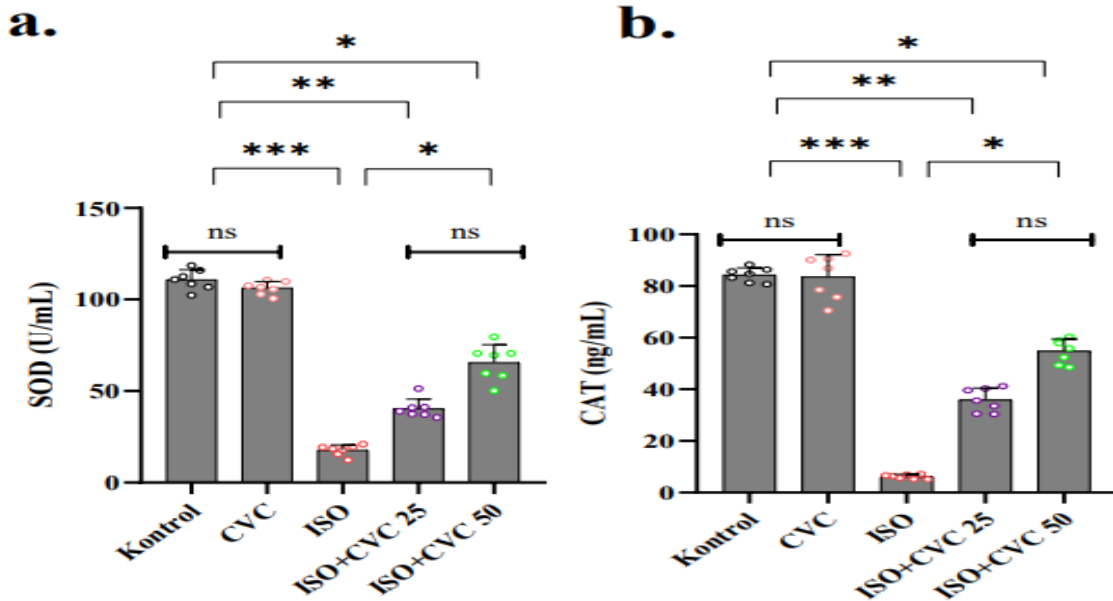
Histopatolojik bulguların birden fazla grup arasında karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki ikili karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi uygulandı.0,05'ten küçük p değeri ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

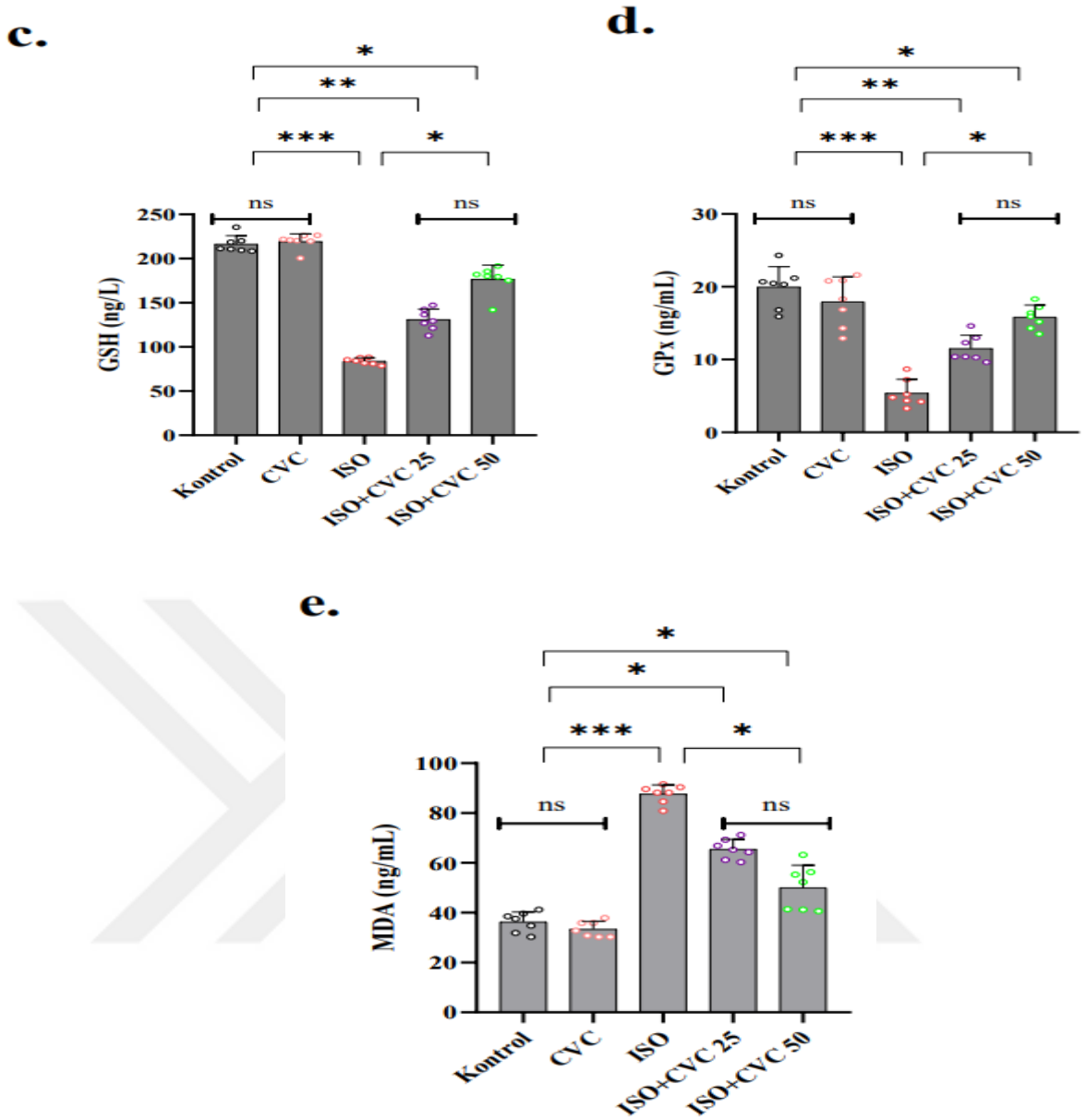
BULGULAR

Karvakrolün Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri

Oksidatif stres belirteçlerinin analizi, kontrol grubuyla CVC ile tedavi edilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p > 0,05$), bu da CVC uygulamasının tek başına bazal oksidatif stres düzeylerini değiştirmedığını göstermektedir. ISO uygulanan grupta, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GPx) dahil olmak üzere temel antioksidan enzimlerin düzeylerinde anlamlı bir azalma vardı ($p < 0,01$). Bu düşüş, ISO kaynaklı oksidatif stres koşulları altında zayıflamış bir antioksidan savunma mekanizmasının olduğunu gösteriyor (**Şekil 7a-d**). Ayrıca, lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehit (MDA), kontrol grubuna kıyasla ISO grubunda önemli bir artış gösterdi ($p < 0,0001$), bu da ISO uygulamasının ortaya çıkardığı oksidatif stresi doğrulamaktadır (**Şekil 7e**).

ISO sonrası CVC uygulanan gruplarda oksidatif stres ölçümlerinde belirgin bir iyileşme görüldü. Özellikle SOD, CAT, GSH ve GPx düzeyleri önemli ölçüde artmış olup, bu da antioksidan kapasitenin geri kazanıldığını göstermektedir ($p < 0,01$). Aynı zamanda, bu gruplarda MDA düzeyleri belirgin şekilde azaldı ($p < 0,01$), bu da lipid peroksidasyonunda ve oksidatif hasarda bir azalma olduğunu göstermektedir (**Şekil 7a-e**). Bu bulgular, CVC'nin antioksidan savunma sistemini güçlendirerek ve oksidatif hasarı azaltarak ISO kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu bir etki uyguladığını göstermektedir. Bu koruyucu etki, CVC'nin oksidatif stresle ilişkili bozuklukları gidermede terapötik potansiyelini vurgulamaktadır.





Şekil 7.Oksidatif stres belirteçlerinin analizi

Karvakrolün Nöroprotektif Etkileri

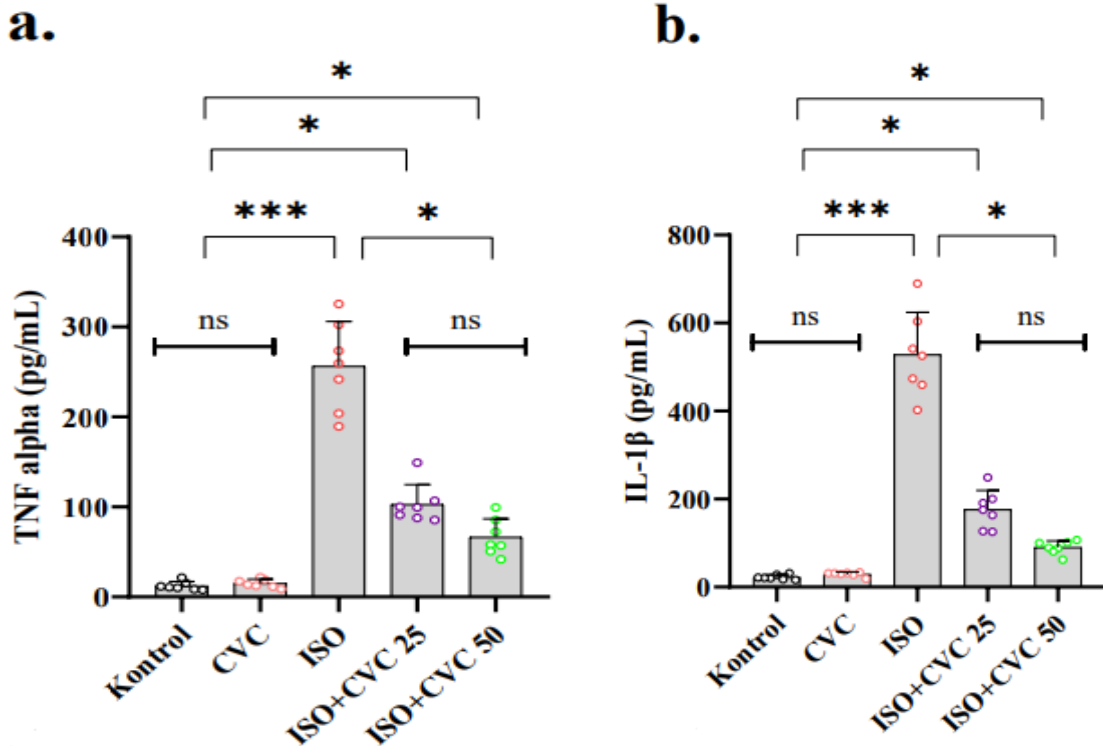
Beyin hasarı belirteçlerinin analizi, kontrol grubu ile sadece CVC tedavisi grubu arasında TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nfl ve GFAP ifade seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığını gösterdi ($p > 0,05$). Sonuçlar, herhangi bir hasara neden olmadan CVC enjeksiyonunun bu belirteçlerin bazal ifadesini değiştirmediğini ve sabit durum koşullarını koruduğunu göstermektedir (Şekil 8a-f).

ISO uygulanan grupta, değerlendirilen tüm belirteçlerin (TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nfl ve GFAP) ifade düzeylerinde önemli bir artış kaydedildi ve kontrol grubuna göre son derece anlamlı farklılıklar gösterdi ($p < 0,0001$). Bu bulgu, ISO kaynaklı durumlarda nöronal ve glial

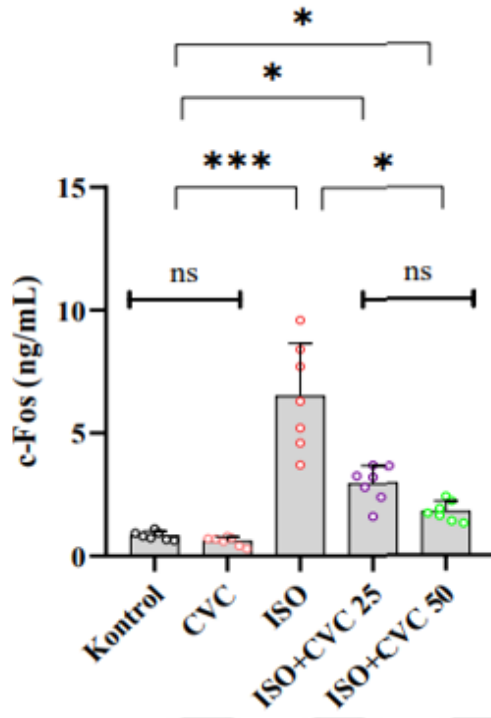
yanıtlarla birlikte inflamasyon ve yaralanmayla ilişkili yolların güçlü bir şekilde aktive olduğunu göstermektedir (Şekil 8a-f).

Önemli olarak, ISO uygulama sonrası CVC uygulanan grupta, bu belirteçlerin ifade düzeyleri ISO grubuna göre belirgin şekilde azaldı ($p < 0,01$). Bu azalma, CVC'nin inflamatuvar yanıtı hafifletme (azalan TNF- α ve IL-1 β ekspresyonuyla kanıtlanmıştır) ve nöronal aktiviteyi ve plastisiteyi düzenleme (cFos ve BDNF seviyelerindeki değişikliklerle gösterildiği gibi) kapasitesinin olduğunu göstermektedir. Nfl ve GFAP ekspresyonundaki azalma, CVC'nin nöronal ve glial hasar göstergelerini azaltmada koruyucu bir işlevi olduğunu gösterir ve dolayısıyla nöroprotektif özelliklerini doğrular (Şekil 8a-f).

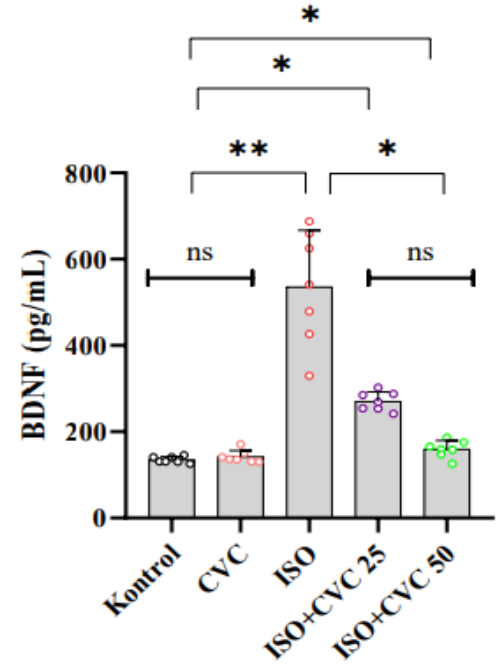
Bu bulgular, CVC'nin normal fizyolojik belirteç ekspresyonunu bozmadığını, ancak ISO kaynaklı beyin hasarına karşı önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, CVC'nin yüksek oksidatif veya inflamatuvar stresin belirgin olduğu durumlarda nöroinflamasyon ve nöronal hasarı hafifletmede terapötik bir fonksiyona sahip olabileceğini göstermektedir.



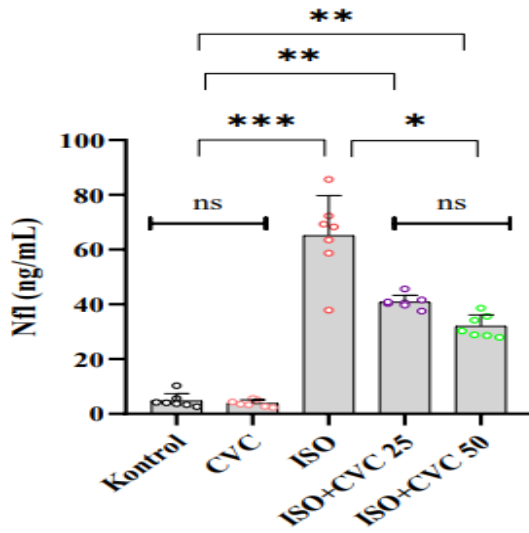
c.



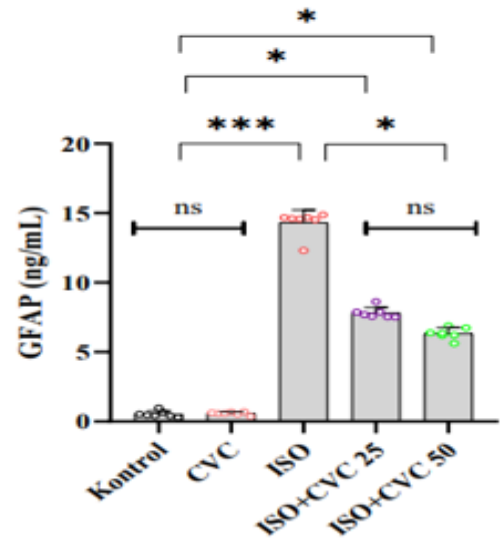
d.



e.



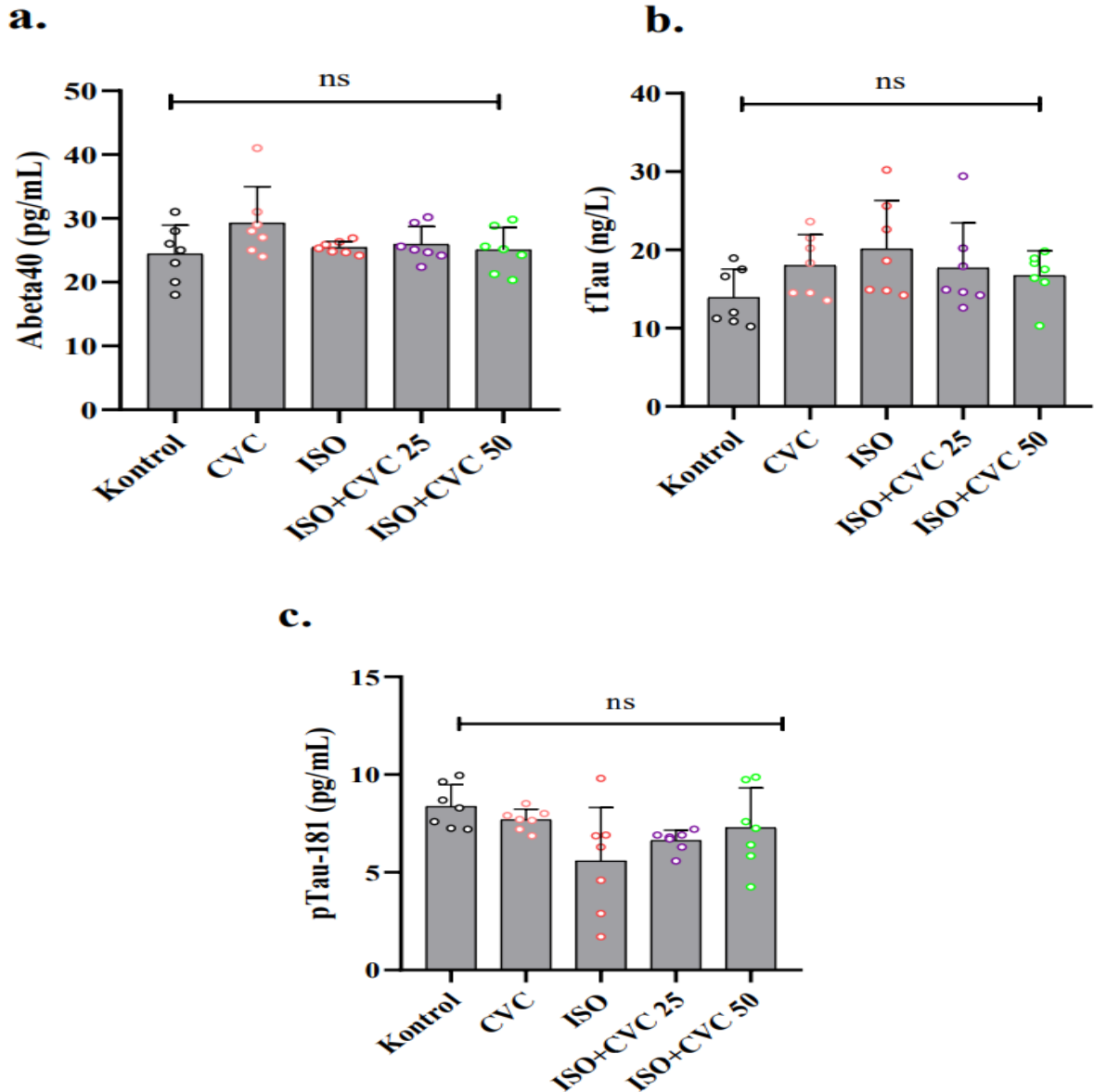
f.



Şekil 8. Beyin hasarı belirteçlerinin analizi

Nöroinflamasyon Belirteçlerinin Analizi

Tüm deney gruplarında A β 40, pTau181 ve tTau'nun ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$). Bu da, bu çalışmanın parametreleri dahilinde, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarla tipik olarak bağlantılı olan bu biyobelirteçlerin konsantrasyonlarının nispeten sabit kaldığını göstermektedir. Diğer biyokimyasal belirteçlerdeki olası değişikliklere rağmen, A β 40, pTau181 ve tTau ekspresyonu uygulanan tedavilere veya müdahalelere yanıt olarak önemli bir değişiklik göstermedi; bu da bu belirli belirteçlerin kullanılan deneysel koşullar veya zaman dilimi altında büyük ölçüde etkilenmeden kalabileceğini göstermektedir (Şekil 9a-c). Sonuç olarak, bu bulgular, en azından bu araştırmanın sınırları içerisinde, diğer parametrelerde gözlenen değişikliklerin, bu temel nörodejeneratif göstergelerin seviyelerindeki değişimlerle ilişkili olmadığını göstermektedir.



Şekil 9. Nöroinflamasyon Belirteçlerinin Analizi

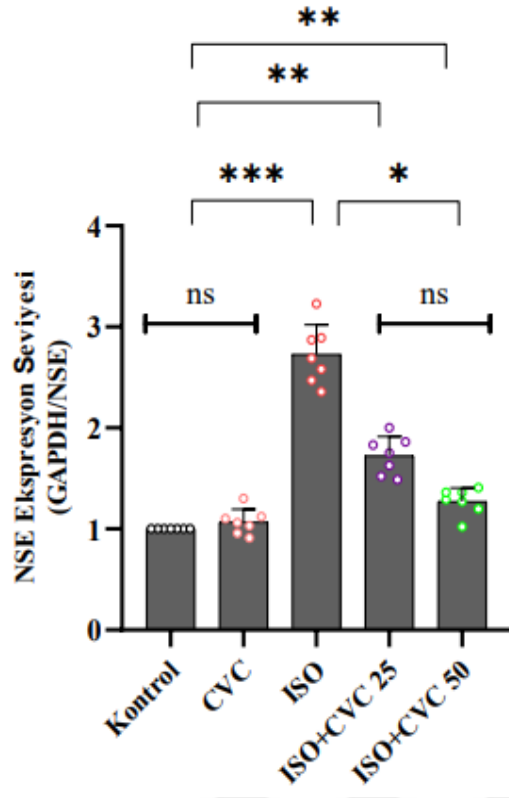
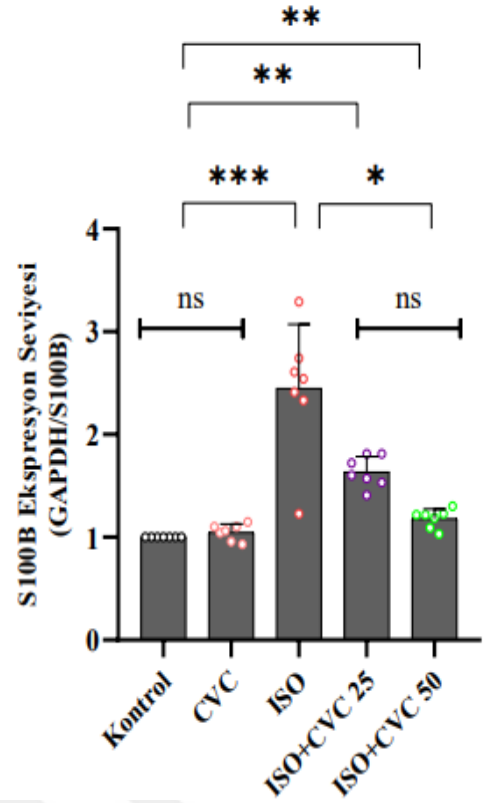
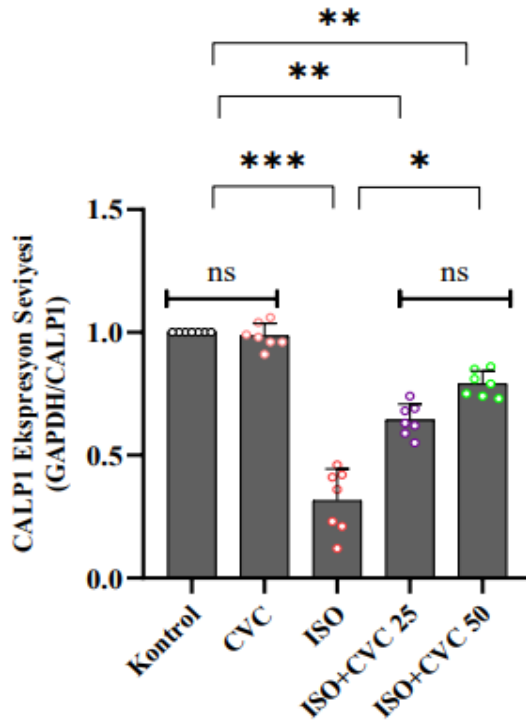
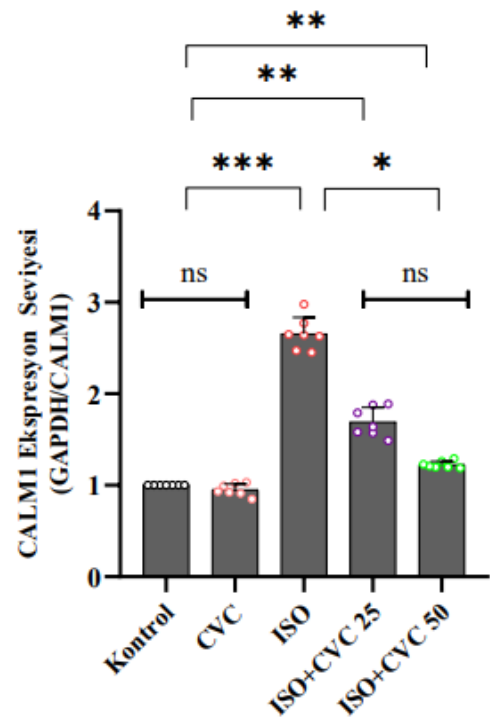
Karvakrolün Mitokondriyal Hasara Etkileri

Mitokondriyal hasar göstergelerinin analizi, NSE, s100B, CALP1 ve CALM1'in mRNA transkript düzeylerinin hem kontrol hem de CVC tedavi gruplarında tutarlı olduğunu ortaya koydu ($p > 0,05$). Bulgular, standart koşullar altında ve CVC tedavisinden sonra mitokondriyal hasar belirteçlerinin ifadesinde önemli bir değişiklik olmadığını göstermektedir; bu da CVC'nin mevcut koşullar altında mitokondriyal bütünlüğü olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir (**Şekil 10a-d**).

ISO uygulanan grupta NSE, s100B, CALP1 ve CALM1 belirteçlerinin mRNA transkript seviyelerinde belirgin bir artış tespit edildi ($p < 0,0001$). Bu artış, ISO'nun hücrel stres ve hasara yol açmadaki yerleşik etkileriyle uyumlu olarak, ISO kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle önemli bir upregülasyon göstermektedir. Bu belirteçlerin mRNA düzeylerindeki artış, mitokondriyal hasar yollarının aktivasyonunu ve potansiyel olarak nörodejeneratif hastalıklara katkıda bulunduğunu göstermektedir (**Şekil 10a-d**).

CVC uygulama grubunda, ISO kaynaklı mitokondriyal stresi takiben bu belirteçlerin mRNA transkript seviyelerinde önemli bir azalma oldu ($p < 0,01$). Bu azalma, CVC tedavisinin, ISO'nun neden olduğu oksidatif ve hücrel stresini hafifleterek, mitokondriyal bütünlük üzerinde koruyucu bir etki sağlayabileceğini göstermektedir. Bu belirteç düzeylerinin yeniden sağlanması, CVC'nin mitokondriyal hasarı hafifletmeye ve indüklenen hasardan sonra hücrel işlevi sürdürmeye önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini göstermektedir (**Şekil 10a-d**).

Bu bulgular bir araya getirildiğinde, CVC'nin normal koşullar altında mitokondriyal hasar belirteçlerini değiştirmemesine rağmen, ISO ile ilişkili mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklanan bu belirteçlerin yükselmesini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Bu durum, CVC'nin mitokondriyal hasara ve ilişkili hücrel süreçlere karşı koruma sağlamada terapötik potansiyel sağlayabileceğini göstermektedir.

a.**b.****c.****d.**

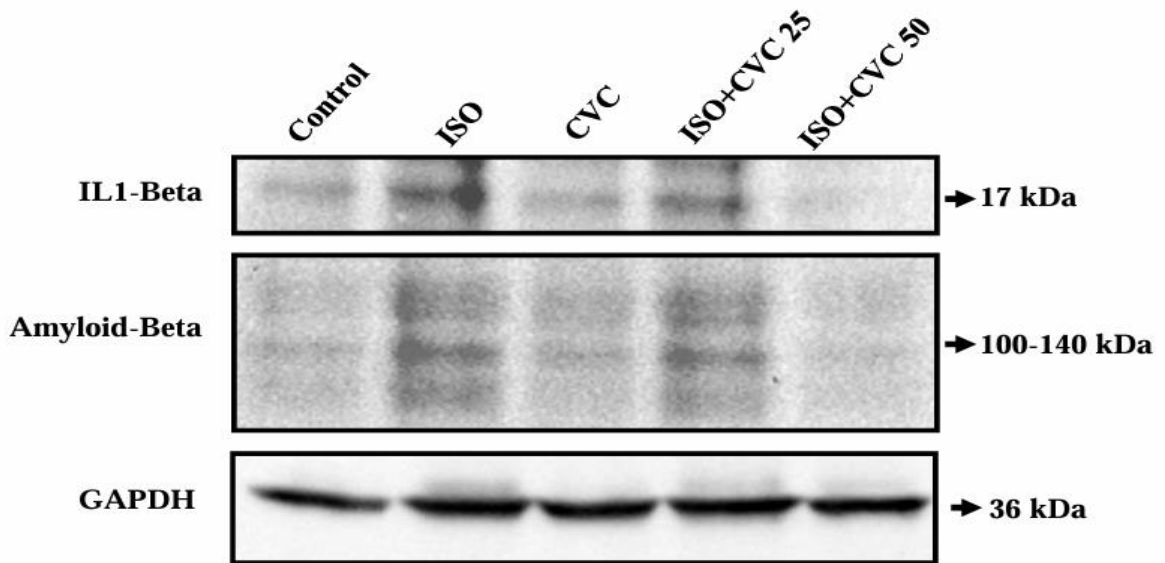
Şekil 10. Mitokondriyal hasar belirteçlerinin analizi

Western Blot Bulguları

Deney gruplarında IL-1 β ve A β ekspresyon düzeylerini değerlendirmek için Western blot (WB) analizi yapıldı. Bulgular, IL-1 β ekspresyonunun ISO grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını, bunun da ISO uygulamasının belirgin bir inflammatuar yanıt oluşturduğunu gösterdi. IL-1 β 'nın yükselmesi, tipik olarak oksidatif stres ve nöroinflamasyonla bağlantılı, yoğunlaşmış bir proinflammatuar durumu gösterir (**Şekil 11**). CVC 50 tedavi grubunda IL-1 β düzeylerinde belirgin bir azalma görüldü ve bu da CVC 50'nin ISO kaynaklı inflammatuar yanıtı hafifletebileceğini göstermektedir. Bu azalma, CVC 50'nin anti-inflammatuar özelliklere sahip olabileceğini ve ISO kaynaklı stres sonrasında IL-1 β gibi proinflammatuar sitokinlerin aşırı üretimini azaltarak dengeyi sağlamaya yardımcı olabileceğini göstermektedir (**Şekil 11**).

Öte yandan, A β düzeylerinin incelenmesi ISO grubunda bir artış olduğunu ortaya koydu ve bu durum ISO uygulamasının nörodejeneratif hastalıkların bir özelliği olan amiloid oluşumunu artırabileceği fikrini doğruladı. Ayrıca, A β 'da ki yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildi ve bu da ISO'nun A β seviyelerini etkileyebilmesine rağmen, değişikliğin bu araştırmanın parametreleri içinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmak için yeterince önemli olmadığını gösteriyor (**Şekil 11**).

Bulgular, CVC 50'nin IL-1 β ekspresyonunu önemli ölçüde etkilediğini ve potansiyel olarak inflamasyonu azalttığını göstermektedir; ancak A β birikimi üzerindeki etkisi, ISO grubunda A β 'da ki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması nedeniyle ek araştırma gerektirmektedir.



Şekil 11. Beyin dokusu western blot görüntüsü

Histopatolojik Bulgular

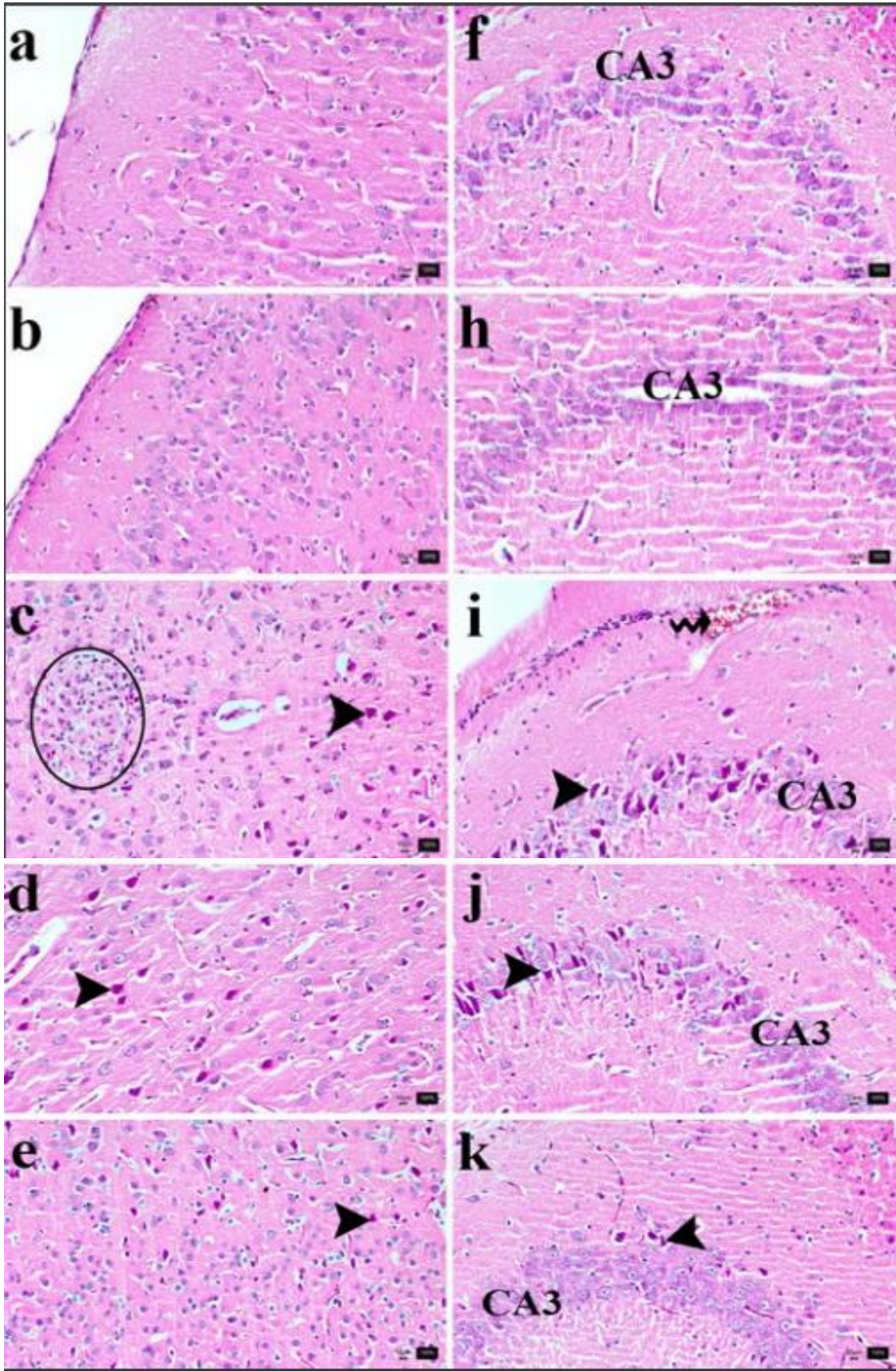
Farklı deney gruplarının serebral korteks ve hipokampal CA3 bölgelerinin lezyon skorları **Tablo 3**'de özetlenmiştir. Kontrol ve Karvakrol gruplarına ait serebral korteks kesitlerinin mikroskopik incelemesinde, sağlam nöronlar ve glia hücreleri de dahil olmak üzere normal beyin histolojisi ortaya çıktı (**Şekil 12a ve 12b**). Nöronlar sağlıklı morfolojiye uygun olarak merkezi yerleşimli veziküler çekirdekler gösterdi. Buna karşın, isoproterenol (ISO) grubundaki sıçanların serebral korteksinde eozinofilik, küçülmüş ve açılı nekrotik nöronlar ve gliozisin de eşlik ettiği önemli değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca nekrotik nöronları çevreleyen mikrogial hücrelerle karakterize edilen nöronofaji gözlemlendi (**Şekil 12c**).

ISO+Karvakrol 25 grubunda nöronal hasar devam etti, dejenerasyon ve nekroz şeklinde ortaya çıktı, ancak şiddeti bir miktar azaldı (**Şekil 12d**). Ancak ISO+Karvakrol 50 grubunda serebral kortekste nöronal hasar belirgin şekilde azaldı, ISO ve ISO+Karvakrol 25 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme gözlemlendi ($p < 0,05$) (**Şekil 12e**).

Hipokampal CA3 bölgesinde, kontrol ve karvakrol gruplarında polimorfik hücre tabakasındaki nöronların sitoplazmasında çok sayıda Nissl cisimciği belirgindi (**Şekil 12f ve 12h**). Buna karşılık, izoproterenol uygulanan sıçanların hipokampal CA3 bölgesinde patolojik konjesyon, küçülmüş hiperkromatik piknotik çekirdekler ve eozinofilik sitoplazmalı hücreler görüldü (**Şekil 12i**). Benzer şekilde ISO+Karvakrol 25 grubunda da ISO grubundaki hücelere benzer şekilde piknotik ve eozinofilik özellikte nekrotik piramidal hücreler hala belirgindi (**Şekil 12j**). Ayrıca, ISO+Karvakrol 50 grubu, hipokampal CA3 bölgesinde nöronal nekrozda anlamlı bir azalma gösterdi; hem ISO hem de ISO+Karvakrol 25 gruplarıyla karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark kaydedildi ($p < 0,05$) (**Şekil 12k**).

Tablo 3. Serebral korteks ve hipokampal CA3'teki histopatolojik bulguların istatistiksel skorları

Gruplar	Ortalama±Standart hata
Kontrol/Beyin Korteksi	0.14±0.14 ^a
CVC50/ Beyin Korteksi	0.00±0.00 ^a
ISO/ Beyin Korteksi	2.85±0.14 ^b
ISO+CVC 25/ Beyin Korteksi	2.42±0.29 ^b
ISO+CVC 50/ Beyin Korteksi	1.00±0.21 ^c
Kontrol/CA3	0.00±0.00 ^a
CVC50/CA3	0.00±0.00 ^a
ISO/CA3	2.71±0.18 ^b
ISO+CVC 25/CA3	2.14±0.34 ^b
ISO+CVC 50/CA3	0.71±0.18 ^c



Şekil 12.Serebral Korteks ve Hipokampal CA3 Bölgesindeki Nöronal Hasarın Histolojik Analizi

TARTIŞMA

Sunulan çalışmada ISO kaynaklı beyin hasarı oluşturulan ratlarda CVC'nin oksidatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki olası terapötik etkileri araştırılmıştır.

İzoproterenol, bir tür beta-adrenerjik agonist ilaçtır ve yüksek dozda verilirse miyokartta iskemiye neden olmaktadır (Knufman, *et al.* 1987; Halıcı *et al.* 2006). Miyokarttaki iskemi, izoproterenolün kalp üzerindeki güçlü pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu etkiler, miyokardın oksijen ihtiyacını artırır, diyastolik dolma basıncını ve koroner perfüzyon basıncını düşürerek miyokartta iskemik değişikliklere neden olur (Rona *et al.* 1959). Eğer miyokard iskemisi uzun süre devam ederse, vücutta oksijen ihtiyacının azalmasına yol açabilir ve yetersiz oksijenlenme de beyin hasarına neden olabilir.

Son yıllarda, bitkisel kaynaklı doğal bileşikler de, daha iyi tedavi seçenekleri ve minimum yan etkileri nedeniyle çeşitli ilaçların sebep olduğu doku,organ hasarları ve toksisitelerini azaltmadaki etkinliklerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bunlardan biri olan karvakrol, kekiğin uçucu yağ fraksiyonunda bulunan monoterpenik bir fenoldür (Baser, 2008) ve antioksidan, anti-bakteriyel ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bir bileşiktir (Friedman, 2014). Alternatif tıbbın hızla gelişmesi, kimyasalların ve toksik maddelerin neden olduğu hasarlarla mücadele etmek için doğal antioksidanların kullanımını artırmış ve araştırmalar bu alana odaklanmıştır. Günümüzde ise farklı doku ve organ hasarlarına karşı çok sayıda bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar kullanılmış ve bu antioksidanların yararlı etkilerinin olduğu çoğunda gösterilmiştir.

Oksidatif stres hücrel hasara önemli ölçüde katkıda bulunur ve çok sayıda nörolojik hastalıkta hayati öneme sahiptir (Pizzino *et al.* 2017; Salim, 2017; Dash *et al.* 2024). Bu çalışmada oksidatif stres belirteçlerinin incelenmesi, CVC uygulamasının hem kontrol hem de CVC uygulanan gruplarda SOD, CAT, GSH ve GPx gibi antioksidan enzimlerin temel seviyelerini önemli ölçüde etkilemediğini gösterdi. Bu durum, CVC'nin tek başına verildiğinde fizyolojik ortamlarda normal antioksidan savunma mekanizmalarını bozmadığını göstermektedir. Ayrıca, ISO kaynaklı oksidatif stres altında, bu antioksidan enzimlerde belirgin bir azalma kaydedildi ve lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'da önemli bir artış görüldü. Bu bulgular, ISO'nun oksidatif stresi tetikleme kapasitesini, bunun sonucunda antioksidan savunma mekanizmasının zayıflamasına ve bunun sonucunda da hücrel hasara yol açan önceki araştırmalarla örtüşüyor. Özellikle, ISO uygulamasından sonra CVC ile tedavi

edilen gruplarda SOD, CAT, GSH ve GPx düzeyleri önemli ölçüde düzeldi ve bu da CVC'nin muhtemelen antioksidan savunma sistemini güçlendirerek güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca, MDA seviyelerindeki belirtilen azalma, CVC'nin lipid peroksidasyonunu ve oksidatif hasarı hafiflettiğine dair kesin kanıt sunuyor. Bulgular, çok sayıda nörodejeneratif hastalığın özelliği olan oksidatif hasarı azaltmada CVC'nin terapötik etkinliğini vurgulamaktadır. Antioksidan enzim seviyelerinin düzelmesi ve MDA seviyelerinin düşürülmesi, CVC'nin hücresel dayanıklılığı artırarak ve ek hasarı önleyerek oksidatif stresle ilişkili bozuklukları hafifletmede etkili olabileceğini gösteriyor. Özudoğlu (2022) tarafından yapılan çalışmada ratlarda tartrazinin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı karvakrolün antioksidan etkisi incelenmiş, ve karvakrol ile tedavi edilen dokularda CAT, GSH, SOD seviyeleri kontrole yaklaşmış, MDA seviyesi de azalmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, karvakrolün, tartrazinin neden olduğu oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkinliğini göstermiştir (Özudoğlu, 2022). Elde edilen bilgiler doğrultusunda ise, karvakrolün oksidatif strese bağlı doku ve organ hasarlarının önlenmesinde olumlu etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Nöroinflamasyon, özellikle oksidatif strese tepki olarak nörolojik hasarda önemli bir faktördür (Adegbola *et al.* 2017; Giri *et al.* 2024; Mao *et al.* 2024; Suleiman Khoury *et al.* 2024). Yapılan çalışma, ISO kaynaklı hasarın TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nfl ve GFAP gibi kritik inflamasyon ve yaralanma ile ilişkili belirteçlerin ifade düzeylerinde önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. Bu belirteçler, nöroinflamasyon, nöronal aktivite ve hasarın biyobelirteçleri olarak kabul edilir ve bunların artışı, ISO uygulamasından sonra güçlü bir inflamasyon ve yaralanma yanıtını gösterir. TNF- α , ve IL-1 β düzeylerinin yükselmesi önemli proinflamatuvar bir duruma işaret ederken, c-Fos ve BDNF'deki değişiklikler yaralanmaya yanıt olarak nöral plastisite ve aktivitenin aktivasyonunu göstermektedir. ISO maruziyetinden sonra CVC enjeksiyonu bu belirteçlerin ekspresyonunda belirgin bir azalmaya yol açtı. TNF- α , ve IL-1 β 'daki azalma, CVC'nin ISO tarafından tetiklenen inflamatuvar yanıtı başarılı bir şekilde hafiflettiğini göstermektedir. c-Fos ve BDNF'nin down regülasyonu, CVC'nin nöronal plastisite ve aktiviteyi etkileyebileceğini, dolayısıyla nöronal hasarı azaltabileceğini ve iyileşmeyi kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca nöronal ve glial hasarın göstergeleri olan Nfl ve GFAP ekspresyonunun azalması, CVC'nin nöroprotektif özelliğini güçlendirir. Guan ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan çalışmada ise, karvakrolün nöroprotektif rolü in vivo ve in vitro olarak incelenmiş ve sonucunda karvakrolün, nöroinflamasyonu, lipid peroksit seviyelerini ve hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Guan *et al.* 2019). Bu çalışmadaki bulgular ise, nörodejeneratif bozuklukların ilerlemesinde nöroinflamasyonun önemini gösteren diğer

araştırmalarla örtüşmektedir ve CVC'nin nöroinflamatuvar yanıtları hafifletme ve nöronal hasara karşı koruma sağlamadaki potansiyelini vurgulamaktadır.

Bu çalışma, A β 40, pTau181 ve tTau gibi nörodejeneratif bozukluklarla sıklıkla ilişkilendirilen belirteçler üzerine CVC'nin etkisini değerlendirmeyi de amaçlamıştır. Bu göstergeler Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarda sıklıkla yükselir ve rutin olarak nöronal hasar ve tauopatileri değerlendirmek için kullanılır. Fakat, bu analiz tüm deney gruplarında A β 40, pTau181 ve tTau'nun ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik ortaya koymadı. Bu, deneysel parametreler ve araştırmanın süresi içerisinde, bu belirli biyobelirteçlerin konsantrasyonlarının ISO tedavisi veya CVC uygulamasından önemli ölçüde etkilenmediğini göstermektedir. ISO uygulaması bu belirteçlerde önemli değişikliklere yol açmasa da, uzun süreli maruziyet veya değişen deneysel koşullar bu biyobelirteçlerin ifadesini etkileyebilir. ISO'nun çeşitli klinik süreçleri tetiklediğinin kabul edilmesi göz önüne alındığında, bu belirli belirteçlerde belirgin değişikliklerin olmamasından sorumlu kesin mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için ek araştırmalara ihtiyaç vardır. Gelecek araştırmalarda, alternatif nörodejeneratif göstergelerin veya daha spesifik nöronal hasar durumlarının, CVC'nin nörodejenerasyon üzerindeki etkisini açıklayabileceğinin kabul edilmesi önemlidir.

Mitokondriyal işlev bozukluğu, çeşitli hücrel hasar türlerinde temel bir rol oynar ve nörodejeneratif bozukluklarla önemli ölçüde ilişkilidir (Hroudová *et al.* 2014; Norat *et al.* 2020; Zong *et al.* 2024). Bu çalışma, ISO kaynaklı mitokondriyal stresin etkilerini değerlendirmek için mitokondriyal hasar göstergelerinin (NSE, s100B, CALP1 ve CALM1) mRNA ifade düzeylerini de değerlendirdi. Öngörüldüğü gibi, ISO uygulaması bu belirteçler için mRNA düzeylerinde önemli bir artışa neden oldu ve bu da ISO'nun mitokondriyal işlev bozukluğunu desteklediğini ve hücrel hasar yollarını aktive ettiğini gösteriyor. Bu artış, ISO'nun hücrel bütünlük üzerindeki olumsuz etkisini, özellikle mitokondriyal bozulmayı vurgulayan önceki araştırmalarla örtüşmektedir. ISO uygulamasından sonra CVC tedavisi ise, mitokondriyal hasar belirteçlerinin ifade seviyelerinde belirgin bir azalmaya yol açtı. Bu azalma, CVC'nin, muhtemelen ISO'nun neden olduğı oksidatif ve hücrel stresi azaltarak, mitokondriyal fonksiyon üzerinde koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşündürmektedir. Mitokondriyal hasar belirteçlerinin iyileşmesi, CVC'nin mitokondriyal bütünlüğün korunmasına yardımcı olabileceğini ve potansiyel olarak mitokondriyal disfonksiyonun ve ilişkili hücrel hasarın ilerlemesini azaltabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu bulgular önemlidir ve CVC'nin, çok sayıda nörodejeneratif hastalıkla ilişkisi nedeniyle daha fazla araştırma gerektiren bir alan olan mitokondriyal korumaya katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Çalışmada, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda önemli bir faktör olan A β birikimi üzerinde CVC'nin etkisi de araştırıldı. ISO grubunda A β düzeylerinde artış görüldü; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç, ISO'nun amiloid prekürsör protein (APP) sürecini etkileyebileceğini ancak bu araştırmanın koşulları altında önemli bir A β birikimine yol açmayacağını göstermektedir. ISO uygulamasını takiben A β düzeylerinde belirgin bir değişikliğin olmaması, bu paradigmada oksidatif stres, nöroinflamasyon ve amiloid patolojisi arasındaki etkileşime ilişkin kritik sorgulamaları gündeme getirmektedir. Ayrıca, CVC'nin A β birikimi üzerindeki etkisi anlamlı değildi; bu da en azından bu araştırmanın deneysel ortamlarında CVC'nin amiloid üretimini önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. Amiloid metabolizması ve birikiminin karmaşık yapısı nedeniyle, daha sonraki araştırmalar, CVC'nin amiloid birikimini etkileme potansiyelini ve nörodejeneratif hastalıklardaki önemini kapsamlı bir şekilde açıklamak için amiloidle ilişkili patolojilerin çeşitli noktalarını, tedavi protokollerini ve modellerini araştırmalıdır.

Bu çalışmanın bulguları, özellikle yüksek dozlarda Karvakrol'ün, serebral korteks ve hipokampal CA3 bölgesinde izoproterenol (ISO) kaynaklı histopatolojik hasara karşı koruyucu etkilerini ortaya koymaktadır (Zare Mehrjerdi *et al.* 2020). ISO grubunda serebral kortekste nekroz, gliosis ve nöronofaji gibi önemli nöronal hasar, hipokampal CA3 bölgesinde konjesyon ve nekrotik değişiklikler gözlemlendi. Bu bulgular, oksidatif stres ve inflamasyona yol açarak hücrel hasara neden olan ISO'nun bilinen nörotoksik etkileriyle örtüşmektedir. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri kanıtlanmış bir fenolik monoterpen olan karvakrol, bu patojenik değişiklikleri doza bağlı bir şekilde hafifletme yeteneğini göstermiştir. ISO+Karvakrol 25 grubunda sadece orta düzeyde iyileşme görüldü, ancak ISO+Karvakrol 50 grubunda nöronal nekroz belirgin şekilde azaldı ve hem serebral kortekste hem de hipokampal CA3 bölgesinde histolojik bütünlük arttı. Nöronal hasardaki azalma, Karvakrol'ün nöroprotektif yeteneklerini vurgulayan önceki araştırmalarla kanıtlandığı gibi, ISO kaynaklı oksidatif stresi ve inflamasyonu hafifleterek koruyucu etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Hipokampal nöronlarda Nissl cisimciklerinin korunması ve serebral kortekste eozinofilik nekrozun azalmış olması, yüksek dozlarda Karvakrol'ün etkinliğini daha da vurgulamaktadır (Amooheydari *et al.* 2022). Bu bulgular, Karvakrol'ün stres durumlarında nöronal bütünlüğün ve işlevselliğin korunmasındaki önemini vurgulayan önceki çalışmalarla örtüşmektedir. Ancak, temel moleküler yolları araştırmak ve çeşitli nörotoksik modeller üzerinde kalıcı koruyucu etkilerini değerlendirmek için ek araştırmalar gereklidir.

Yapılan diğ er çalışmalar ve bu çalışmadaki sonuçlar, CVC'nin oksidatif stres belirteçlerini, nöroinflamatuvar yolları, mitokondriyal hasarı ve belirli beyin hasarı belirteçlerini önemli ölçüde etkilediğini ve dolayısıyla nöroprotektif bir ilaç olma potansiyelini güçlendirdiğini göstermektedir.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ratlarda ISO ile indüklenen beyin hasarı üzerine, antioksidan özellikler taşıyan CVC'nin potansiyel koruyucu etkileri deneysel hayvan modeliyle gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda elde edilen çıkarımlar kısaca aşağıda belirtilmiştir.

1. Çalışma sonucunda ISO'nun, hücre membran hasarı belirteçlerinden olan MDA seviyelerinde artışa neden olduğu belirlendi. Ayrıca SOD, KAT, GPx gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile nonenzimatik bir antioksidan olan GSH seviyelerinde azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Tedavi amacıyla verilen CVC dozlarının (25 ve 50 mg/kg) MDA düzeylerini azalttığı belirlendi. SOD, KAT, GPx aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde artış sağladığı ve böylelikle CVC'nin antioksidan özellik gösterdiği tespit edildi.

2. İzoproterenol TNF- α , IL-1 β , c-Fos, BDNF, Nfl ve GFAP gibi beyin hasarı belirteçlerinin düzeylerinde artışa neden olmuş, beyin dokularında nöronal ve glial yanıtlarla birlikte inflamasyon ve yaralanmayla ilişkili yolların güçlü bir şekilde aktive olmasını sağlamıştır. CVC uygulaması ise, bu belirteçlerin ifade düzeylerini ISO grubuna göre belirgin şekilde azaltmış ve böylece CVC'nin inflamatuvar yanıtı hafifletme, nöronal aktiviteyi ve plastisiteyi düzenleme kapasitesinin olduğunu ve dolayısıyla nöroprotektif özelliklerini doğrulamıştır.

3. Çalışmada, diğer biyokimyasal belirteçlerdeki olası değişikliklere rağmen, A β 40, pTau181 ve tTau'nun ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi bu da, bu çalışmanın parametreleri dahilinde, nörodejeneratif bozukluklarla tipik olarak bağlantılı olan bu biyobelirteçlerin konsantrasyonlarının nispeten sabit kaldığı tespit edildi.

4. İzoproterenol NSE, s100B, CALP1 ve CALM1 belirteçlerinin mRNA transkript seviyelerinde belirgin bir artışa neden olarak mitokondriyal hasar yollarının aktivasyonunu indüklemiştir. CVC uygulaması bu parametrelerin düzeyini azaltmış ve mitokondriyal hasarı hafifletmeye ve indüklenen hasardan sonra hücresel işlevi sürdürmesinde etkili olmuştur.

5. İzoproterenol IL-1 β ve A β gibi inflamasyon belirteçlerinin düzeylerinde artışa neden olmuş, beyin dokularında nöroinflamasyonun hızlanmasını sağlamıştır. CVC (50 mg/kg) uygulaması ise IL-1 β düzeylerinde azalma sağlamış ve inflamasyonu azalttığını göstermiştir ancak A β seviyelerini etkileyebilmesine rağmen, değişikliğin bu araştırmanın parametreleri içinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmak için yeterli olmadığı tespit edildi.

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular bütünüyle değerlendirildiğinde, CVC'nin ISO kaynaklı oksidatif strese, nöroinflamasyona ve mitokondriyal disfonksiyona karşı koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalar, CVC'nin antioksidan savunmayı iyileştirdiğini, inflamasyon tepkilerini azalttığını ve mitokondriyal hasarı hafiflettiğini, böylece oksidatif ve inflamatuvar strese bağlı hastalıklar için potansiyel olarak terapötik avantajlar sağladığını göstermektedir. Elde edilen bulgular, CVC'nin nöroprotektif bir ajan olma potansiyelini kanıtlamaktadır ancak CVC'nin A β birikimi ve nörodejeneratif biyobelirteçler üzerindeki etkisi henüz net değildir; bu nedenle nörodejeneratif hastalıklardaki rolünü açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bununla birlikte mevcut çalışma bu alanda yapılacak çalışmalara ışık tutması ve destek vermesi bakımından da önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adegbola, P., Aderibigbe, I., Hammed, W., Omotayo, T., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review. *American journal of cardiovascular disease*, 7(2), 19–32.
- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I., 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 32(1), 31–36.
- Akar, M., Aydemir, Ö., Oğuz, Ş.S., Erdeve, Ö., Aydemir, C., Gökmen, T., 2017. Evaluation of whole body hypothermia on term neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *Turkish Journal of Pediatric Disease*, 46(4), 286-91.
- Amooheydari, Z., Rajaei, Z., Alaei, H., Esmaeil, N., 2022. Supplementation of Carvacrol Attenuates Hippocampal Tumor Necrosis Factor-Alpha Level, Oxidative Stress, and Learning and Memory Dysfunction in Lipopolysaccharide-Exposed Rats. *Advanced biomedical research*, 11, 33.
- Andelius, T.C.K., Kyng, K.J., Heiring, C., Henriksen, T.B 2020. Asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Ugeskrift for laeger*, 30, 182(14A): V12190704.
- Askarova, S., Yang, X., Lee, J. C., 2011. Impacts of membrane biophysics in Alzheimer's disease: from amyloid precursor protein processing to $\alpha\beta$ Peptide-induced membrane changes. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 134971.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B., 2019. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Azizi, Z., Majlessi, N., Choopani, S., & Naghdi, N., 2022. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, 12(4), 371–387.
- Baser, K.H., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current pharmaceutical design*, 14(29), 3106–3119.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslu, S., Demirustu, C., Aral, E., & Husnu Can Baser, K., 2008. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 15(6-7), 447–452.
- Cánovas-Ahedo, M., Alonso-Alconada, D., 2019. Combined therapy in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Anales de pediatria*, 100(4), 275-286.
- Chaachouay, N., Zidane, L., 2024. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. *Drugs Drug Candidates*, 3(1), 184-207.
- Chen, B., Deng, X., Wang, B., Liu, H., 2016. Etanercept, an inhibitor of TNF- α , prevents propofol-induced neurotoxicity in the developing brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 55, 91–100.
- Cooper, E. H., 1994. Neuron-specific enolase. *The International journal of biological markers*, 9(4), 205–210.

- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., & Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15), 6300–6308.
- D'Ambrosi, J., Amin, N., 2018. Hyperinflation of Isoproterenol. *Journal of pharmacy practice*, 31(4), 390–394.
- Dash, U.C., Bhol, N.K., Swain, S.K., Samal, R.R., Nayak, P.K., Raina, V., Panda, S.K., Kerry, R.G., Duttaroy, A.K., Jena, A.B., 2024. Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications. *Acta Pharm. Sin. B*, 15(1), 15–34.
- Dati, L. M., Ulrich, H., Real, C. C., Feng, Z. P., Sun, H. S., & Britto, L. R., 2017. Carvacrol promotes neuroprotection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience*, 356, 176–181.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., & Silano, M., 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7-8), 801–804.
- Deisenhammer, F., Egg, R., Giovannoni, G., Hemmer, B., Petzold, A., Sellebjerg, F., Teunissen, C., Tumani, H., 2009. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *European journal of neurology*, 16(6), 760–770.
- Deng, W., Lu, H., & Teng, J., 2013. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 51(3), 813–819.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., & Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(6), 1008–1022.
- Donato, R., 1986. S-100 proteins. *Cell Calcium*, 7, 123–145.
- Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D., 2015. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA pediatrics*, 169(4), 397–403.
- Dumbuya, J.S., Chen, L., Wu, J.Y., Wang, B., 2021. The role of G-CSF neuroprotective effects in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE): current status. *J. Neuroinflammation*, 18(1), 55.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25(9-10), 1439–1451.
- Ettinger, A., Laumark, A. B., Ostroff, R. M., Brundell, J., Baumgartner, W. A., Razumovsky, A. Y., 1999. A new optical immunoassay for detection of S-100B protein in whole blood. *The Annals of thoracic surgery*, 68(6), 2196–2201.
- Friedman, M. 2014. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4- isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(31), 7652–7670.
- Galic, M. A., Riazi, K., & Pittman, Q. J., 2012. Cytokines and brain excitability. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(1), 116–125.
- Gandova, V., Lazarov, A., Fidan, H., Dimov, M., Stankov, S., Denev, P., Ercisli, S., Stoyanova, A., Gulen, H., Assouguem, A., Farah, A., Ullah, R., Kara, M., Bari, A., 2023. Physicochemical and biological properties of carvacrol. *Open Chem*, 21(1), 20220319.

- Garcia-Alix, A., Arnaez, J., Arca, G., Martinez-Biarge, M., 2024. Hypoxic-ischaemic encephalopathy code: A systematic review for resource-limited settings. *An. Pediatria*, 100(4), 275–286.
- Giri, P. M., Banerjee, A., Ghosal, A., Layek, B., 2024. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders: Current Knowledge and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*, 25(7), 3995.
- Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., Itohara, S., 1995. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*, 14(1), 29–41.
- Greco, P., Nencini, G., Piva, I., Scioscia, M., Volta, C. A., Spadaro, S., Neri, M., Bonaccorsi, G., Greco, F., Cocco, I., Sorrentino, F., D'Antonio, F., & Nappi, L., 2020. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta neurologica Belgica*, 120(2), 277–288.
- Guan, X., Li, X., Yang, X., Yan, J., Shi, P., Ba, L., Cao, Y., Wang, P., & Wang, P., 2019. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation. *Life Sciences*, 235, 116795.
- Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651–715.
- Guo, Y., Wang, Q., Chen, S., Xu, C., 2021. Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. *Metabolism: clinical and experimental*, 115, 154454.
- Gupta, V., Lahiri, S. S., Sultana, S., Tulsawani, R. K., & Kumar, R., 2010. Anti-oxidative effect of *Rhodiola imbricata* root extract in rats during cold, hypoxia and restraint (C-H-R) exposure and post-stress recovery. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(4), 1019–1025.
- Gündüz, Ö., 2010. Sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon sırasında oluşan stres hasarına karşı, karvakrolün olası koruyucu etkilerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Osman Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir*.
- Haddadi, H., Rajaei, Z., Alaei, H., & Shahidani, S., 2018. Chronic treatment with carvacrol improves passive avoidance memory in a rat model of Parkinson's disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 76(2), 71–77.
- Halıcı, Z., Bayır Y., Süleyman, H., Çadırcı, E., Keleş, MS., Bayram, E., 2006. Investigation of the Effects of, on Serum Eritropoietin Levels in Isoproterenol-induced Acute and Chronic Myocardial Infarct Model of Rats. *Eurasian J Med*, 38, 68-72.
- Heizmann, C.W., Fritz, G., Schäfer, B.W., 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci*, 7, d1356–d1368.
- Hroudová, J., Singh, N., Fišar, Z., 2014. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *BioMed research international*, 2014, 175062.
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4), 287–293.

- Ikura, M., & Ames, J. B., 2006. Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1159–1164.
- Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., Arshad, M. U., Abdelgawad, M. A., El-Ghorab, A. H., Khames, A., Shariati, M. A., Ahmad, A., Hussain, M., Imran, A., & Islam, S. 2022. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food science & nutrition*, 10(11), 3544–3561.
- Javed, H., Mohamed Fizur, N. M., Jha, N. K., Ashraf, G. M., & Ojha, S., 2023. Neuroprotective Potential and Underlying Pharmacological Mechanism of Carvacrol for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Current neuropharmacology*, 21(6), 1421–1432.
- Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., McCauley, R. D., & Hall, J. C., 2003. Glutathione. *ANZ journal of surgery*, 73(7), 517–522.
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., & Ergul, A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*, 4, 5.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M., 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*, 97(10), 2499–2574.
- Kahn, D.S., Rona, G., Chappel, C.I., 1969. Isoproterenol-induced cardiac necrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 156(1), 285-293.
- Kamtchum-Tatuene, J., & Jickling, G. C., 2019. Blood Biomarkers for Stroke Diagnosis and Management. *Neuromolecular medicine*, 21(4), 344–368.
- Kandemir, F. M., Caglayan, C., Darendelioglu, E., Küçükler, S., İzol, E., Kandemir, Ö., 2021. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. *Life sciences*, 277, 119610.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016. Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg*, 1 (1).
- Karlsson, J. E., Rosengren, L. E., Haglid, K. G., 1991. Quantitative and qualitative alterations of neuronal and glial intermediate filaments in rat nervous system after exposure to 2, 5- hexanedione. *Journal of neurochemistry*, 57(4), 1437-1444.
- Kayaalp, O., Gümüsel, B., Babaoğlu MÖ., Melli, M., 2012. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. *Pelikan yayıncılık*, 1848 s, Ankara.
- Khalil, A., Kovac, S., Morris, G., & Walker, M. C., 2017. Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death, and cognitive decline. *Epilepsia*, 58(2), 263–273.
- Knufman, N. M., Van der Laarse, A., Vliegen, H. W., & Brinkman, C. J., 1987. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 57(1), 15–32.
- Koparal, A. T., & Zeytinoglu, M., 2003. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43(1-3), 149–154.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*, 85, 633–640.

- Kumar, M., Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Kumar, V., Lahkar, M., 2017. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of quercetin in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(1), 1–8.
- Lai, M. C., & Yang, S. N., 2011. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 609813.
- Lee, B., Yeom, M., Shim, I., Lee, H., & Hahm, D. H., 2020. Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 24(1), 27–37.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lumpkins, K. M., Bochicchio, G. V., Keledjian, K., Simard, J. M., McCunn, M., Scalea, T., 2008. Glial fibrillary acidic protein is highly correlated with brain injury. *The Journal of trauma*, 65(4), 778–784.
- Mączka, W., Twardawska, M., Grabarczyk, M., Wińska, K., 2023. Carvacrol—A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 12(5), 824.
- Mao, X.W., Pecaut, M.J., Stanbouly, S., Nelson, G., 2024. Oxidative stress, neuroinflammation, and the blood-brain barrier biomarkers on the brain response to spaceflight. *Life Sci. Sp. Res.*, 43, 22–28.
- Molloy, E.J., El-Dib, M., Soul, J., Juul, S., Gunn, A.J., Bender, M., Gonzalez, F., Bearer, C., Wu, Y., Robertson, N.J., Cotton, M., Branagan, A., Hurley, T., Tan, S., Laptook, A., Austin, T., Mohammad, K., Rogers, E., Luyt, K., Wintermark, S.L., Bonifacio, S.L., Bonifacio, P., Wintermark, H., Aly, V., Chau, H., Glass, M., Lemmon, C., Wusthoff, G., deVeber, A., Pardo, M., Carrasco, J., Boardman, D., Gano, E., 2024. Neuroprotective therapies in the NICU in preterm infants: present and future (Neonatal Neurocritical Care Series). *Pediatr. Res.*, 95, 1224–1236.
- Norat, P., Soldozy, S., Sokolowski, J. D., Gorick, C. M., Kumar, J. S., Chae, Y., Yağmurlu, K., Prada, F., Walker, M., Levitt, M. R., Price, R. J., Tvrdik, P., Kalani, M. Y. S., 2020. Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. *NPJ Regenerative medicine*, 5(1), 22.
- Ogata, A., Kimura, Y., Ikenuma, H., Yamada, T., Abe, J., Koyama, H., Suzuki, M., Ichise, M., Kato, T., & Ito, K., 2020. Brain pharmacokinetics and biodistribution of ¹¹C-labeled isoproterenol in rodents. *Nuclear medicine and biology*, 86–87, 52–58.
- Oğlakçı İlhan, A., 2016. Ratlarda İsoproterenol İle Oluşturulan Kalp Krizi Modelinde Kronik Alkol Kullanımının Miyokardiyal Apoptoz Üzerine Etkisi Ve Kalpain İnhibitörü 1'in (N-Asetil-Lösin-Lösin-Norlösin) Kardiyoprotektif Rolünün Araştırılması. Doktora Tezi, Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Özdoğan, M., 2022. Tartrazin ile Oksidatif Stres Oluşturulan Ratlarda Karvakrolün Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Özgün, E., 2013. İsoproterenol İle Deneysel Miyokart Enfarktüsü Oluşturulan Sıçanlarda Melatoninin Serum Paraoksonaz Aktivitesine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Edirne.

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763.
- Poesen, K., De Schaepdryver, M., Stubendorff, B., Gille, B., Muckova, P., Wendler, S., Prell, T., Ringer, T. M., Rhode, H., Stevens, O., Claeys, K. G., Couwelier, G., D'Hondt, A., Lamaire, N., Tilkin, P., Van Reijen, D., Gourmaud, S., Fedtke, N., Heiling, B., Rumpel, M., ... Van Damme, P., 2017. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology*, 88(24), 2302–2309.
- Ranjan, A.K., Gulati, A., 2023. Advances in Therapies to Treat Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of clinical medicine*, 12(20), 6653.
- Rona, G., Chappel, C.I., Balazs, T., Gaudry, R., 1959. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol*, 67(4), 443–55.
- Salim S., 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 360(1), 201–205.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., & Samini, F., 2015. Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. *Experimental animals*, 64(1), 65–71.
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy research : PTR*, 32(9), 1675–1687.
- Sharma, A., Kaur, P., Kumar, B., Prabhakar, S., Gill, K.D., 2008. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. *Parkinsonism and Related Disorders*, 14 (1), 52–57.
- Sies, H., 2020. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(9), 852.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat science*, 80(2), 159–166.
- Suleiman Khoury, Z., Sohail, F., Wang, J., Mendoza, M., Raake, M., Tahoori Silat, M., Reddy Bathinapatta, M., Sadeghzadegan, A., Meghana, P., Paul, J., 2024. Neuroinflammation: A Critical Factor in Neurodegenerative Disorders. *Cureus*, 16(6), e62310.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D., 2015. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 6, 221.
- Tan, S., & Parks, D.A., 1999. Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clinics in perinatology*, 26(3), 733–viii.
- Tan, S., Zhou, F., Nielsen, V. G., Wang, Z., Gladson, C. L., & Parks, D. A., 1998. Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57(6), 544–553.
- Uyanoglu, M., Canbek, M., Aral, E., & Husnu Can Baser, K., 2008. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 15(3), 226–229.

- Varhaug, K. N., Torkildsen, Ø., Myhr, K. M., Vedeler, C. A., 2019. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Frontiers in neurology*, 10, 338.
- Vilcek, J., 2008. First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *Journal of immunology*, 181(1), 5–6.
- Volpe, J.J., 2012. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Annals of neurology*, 72(2), 156–166.
- Wang, X., Sun, Y., Li, T., Cai, Y., & Han, Y., 2020. Amyloid- β as a Blood Biomarker for Alzheimer's Disease: A Review of Recent Literature. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 73(3), 819–832.
- Zare Mehrjerdi, F., Niknazar, S., Yadegari, M., Akbari, F. A., Pirmoradi, Z., Khaksari, M., 2020. Carvacrol reduces hippocampal cell death and improves learning and memory deficits following lead-induced neurotoxicity via antioxidant activity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393(7), 1229–1237.
- Zhang, D., Gan, R.-Y., Ge, Y.-Y., Yang, Q.-Q., Ge, J., Li, H.-B., & Corke, H., 2018. Research progress on the antibacterial mechanisms of carvacrol: A mini review. *Çinde Bioactive Compounds in Health and Disease*, 1(6), 71-81.
- Zimmer, D. B., Chaplin, J., Baldwin, A., Rast, M., 2005. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 51(2), 201–214.
- Zong, Y., Li, H., Liao, P., Chen, L., Pan, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Liu, D., Zheng, M., Gao, J., 2024. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 124.
- Zotti, M., Colaianna, M., Morgese, M. G., Tucci, P., Schiavone, S., Avato, P., & Trabace, L., 2013. Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(6), 6161–6172.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	Betül BAĞCI
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Lisesi
Lisans:	İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı (2025)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. Bağcı, B., Aydın, Ş., Dalkılıç, E., Çomaklı, S., Küçükler, S., & Özdemir, S. (2025). Neuroprotective potential of carvacrol: restoration of oxidative balance and mitigation of brain injury markers in isoproterenol-induced rats. <i>Metabolic brain disease</i> , 40(5), 211.	