



# Deneysel Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Piceatannolün Beyinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Effects of Piceatannol on Endoplasmic Reticulum Stress on Brain in Rats with Experimental Subarachnoid Hemorrhage

✉ Berna ÖZBEY, ✉ Metehan UZUN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Subaraknoid kanama (SAK) insanlarda beyin hasarına ve ölüme yol açan, günümüzde henüz kesin bir tedavisi olmayan bir hastalıktır. SAK'ın patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte erken beyin hasarı (EBH) en önemli neden olarak gösterilmektedir. EBH'nin nedenlerinden bir tanesi de endoplazmik retikulum stresidir (ERS). ERS beyin hücrelerinde apoptoza ve kan-beyin bariyerinin bozulmasına yol açmaktadır. Bu çalışmada deneysel SAK modeli oluşturulmuş sıçanlarda piceatannolün (PST) frontal korteksteki ERS ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 8-10 haftalık Wistar Albino sıçanlardan SHAM (n=8), SAK (n=8) ve PST (n=8) olmak üzere üç grup oluşturuldu. SAK ve PST gruplarında, 120 µL otolog arteriyel kan prekiyazmatik sisternaya enjekte edilerek SAK modeli oluşturuldu. PST grubuna SAK sonrası 60. dakikada 30 mg/kg PST intraperitoneal uygulandı. Tüm gruplarda SAK öncesi ve sonrası Garcia nörolojik muayene skorlaması yapıldı. SAK'tan 24 saat sonra frontal korteks dokuları alınarak histopatolojik ve genetik analizler gerçekleştirildi.

**Bulgular:** PST uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmak üzere nörodavranışsal test sonuçlarında iyileşmeye (p<0,01; p<0,05) ve histopatolojik düzeyde piknoz (p<0,001), ödem (p<0,001) ve TUNEL<sup>+</sup> apoptotik hücre sayısında (p<0,05) azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. SAK grubunda GRP78 (p=0,01), ATF4 (p=0,01) ve CHOP (p<0,05) gen ekspresyon seviyeleri SHAM grubuna göre yüksek bulundu. PST uygulaması SAK'ta artan tüm ERS göstergelerini azaltıcı etki gösterdi. Bu azalma GRP78 için istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). PST ayrıca SAK'ta artan p53 (p<0,01) gen ekspresyon değerlerini azaltıcı etki gösterdi.

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

**Anahtar Kelimeler:** Subaraknoid kanama, erken beyin hasarı, piceatannol, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz

## ABSTRACT

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

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

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Metehan UZUN, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

**Tel.:** +90 543 582 86 82 **E-posta:** metehanuzun@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-1406-5473

**Geliş tarihi/Received:** 28.02.2024 **Kabul tarihi/Accepted:** 20.03.2024

**Not:** Bu çalışma ilk isim yazarın yüksek lisans tezinin bir kısmından üretilmiştir.

©Telif Hakkı 2024 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.  
©Copyright 2024 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.  
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.



**Results:** Our results indicated that PST treatment significantly improved Garcia scores ( $p<0.01$ ;  $p<0.05$ ). In addition, PST decreased pyknosis ( $p<0.001$ ) and edema ( $p<0.001$ ) levels, and the number of damaged cells ( $p<0.01$ ) and apoptotic cells ( $p<0.05$ ). GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein;  $p=0.01$ ), ATF4 (Activating transcription factor 4;  $p=0.01$ ), and CHOP (C/EBP homologous protein;  $p<0.05$ ) gene expression levels of the SAH group were increased compared to SHAM. Moreover, PST significantly decreased the expression levels of p53 ( $p<0.01$ ).

**Conclusion:** Our results showed that PST indicated protective effects on ERS after SAH. It could be suggested that PST might be a supportive adjuvant agent in SAH management.

**Keywords:** Subarachnoid hemorrhage, early brain injury, piceatannol, endoplasmic reticulum stress, apoptosis

## GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), normalde beyin omurilik sıvısı ile dolu olan ve araknoid ile pia mater arasında yer alan bölgeye kan sızması olarak tanımlanır. SAK, yüksek morbidite ve mortalite ile seyrederek ve tüm inmelerin %3-10'luk bir kısmından sorumludur<sup>1</sup>. SAK en çok 40-60 yaş aralığında görülür, kanama sonrası 1. ayda mortalite oranı %50'ye kadar ulaşır<sup>2</sup>.

SAK patogenezinin altında yatan en temel mekanizma ilk 3 gün içerisinde ortaya çıkan erken beyin hasarıdır (EBH). EBH beyin iskemisi, kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulması, beyin ödemi, oksidatif stres, enflamatuvar yolakların aktivasyonu ve nöronal apoptoz dahil bir dizi karmaşık patofizyolojik süreci içerir<sup>3</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri gibi hücre içi organellerin fonksiyonlarındaki bozuklukların da SAK patofizyolojisine dahil edilebileceğini göstermiştir<sup>4</sup>. SAK sonrası ortaya çıkan hücre ölümlerinin bir kısmından ER stresinin (ERS) sorumlu olduğu ve ERS'nin endotel hücrelerinin apoptozisine ve KBB'nin bozulmasına kadar gidebilen apoptotik süreçleri başlattığı bilinmektedir<sup>5</sup>. Bu nedenle SAK'ta ERS'yi azaltmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ERS ER'deki protein katlama kapasitesi ile işlenen protein yükü arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır<sup>6</sup>. Hücrede sentezlenen polipeptitler sürekli olarak yanlış katlanma veya sitotoksik kompleksler halinde toplanma riski altındadır. Moleküler şaperonlar, proteinin yeniden katlanmasına yardımcı olarak ve protein agregasyonunu önleyerek bu sitotoksitesi giderirler<sup>7</sup>. Bu nedenle proteinler sürekli olarak şaperon denetiminden geçerler<sup>8</sup>. ER'de protein katlanmaları, BiP veya diğer adıyla GRP78 (78-kDa glukozla düzenlenen protein) ve GRP94 (94-kDa glukozla düzenlenen protein) gibi ER şaperon proteinleri ve protein disülfid izomeraz ile peptidil-prolil izomeraz gibi enzimler tarafından kolaylaştırılır<sup>9</sup>. ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ER homeostazındaki değişikliklere ve sonuç olarak ERS'nin uyarılmasına neden olur<sup>10</sup>. Yanlış katlanmış veya katlanamamış proteinler, ER içinde bulunan ER ile ilişkili protein degradasyonu (ERAD) kontrol sistemi ile yıkıma uğratılırlar ve böylece protein dengesi korunur<sup>11</sup>. Bununla birlikte protein dengesini korunmasında bazen ERAD mekanizması yeterli gelmez, böyle durumlarda hücrede katlanmamış protein yanıtı (UPR) ismi

verilen yolak aktif hale gelir<sup>12-14</sup>. Bu yolak, ER fonksiyonundaki homeostazının yeniden sağlanması için gerekli önemli bir sinyal mekanizmasıdır<sup>15</sup>. Bu yolağın aktivasyonu (a) protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), (b) inositol gerektiren enzim-1 ve (c) aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olmak üzere üç temel sensör protein tarafından sağlanır.

ERS ile oksidatif stresin SAK'ta EBH patogenezinin katkıda bulunduğu yapılan birçok çalışmada da ifade edilmektedir<sup>16,17</sup>. Bu nedenle SAK'ta ERS'nin azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması tedavi seçenekleri arasında değerlendirilmektedir. Bu amaçla birçok molekül üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. ERS'nin azaltılması için düşünülen aday moleküllerden bir tanesi de piceatannoldür (PST).

Yaban mersini, üzüm ve çarkıfelek meyvesi tohumlarında yaygın olarak bulunan PST bir resveratrol (RES) hidroksil analogudur<sup>18</sup>. PST, RES'e göre daha yüksek bir biyoyararlanım oranına sahiptir<sup>19-21</sup>. Bu durum PST'nin RES'e alternatif bir molekül olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. PST'nin tedavi edici yönü sahip olduğu anti-enflamatuvar, anti-oksidatif ve anti-proliferatif etkinliği sayesinde gerçekleştirilmektedir<sup>22</sup>. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda PST'nin ERS'yi azaltıcı veya ERS'ye karşı koruyucu etkinliği de ortaya konulmuştur<sup>13,23</sup>. PST'nin ERS üzerine olan etkileri karaciğer, osteoblast hücreleri, endotelial hücreler gibi hücre ve organlarda ortaya konulmuştur<sup>13,23</sup>. PST'nin ERS üzerine nasıl bir etki gösterdiği henüz araştırılmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda PST'nin SAK'ta frontal kortekste ERS düzeyi üzerine bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.03.2021 tarih ve 2021/02-08 sayılı izni ile yürütüldü. Çalışmanın hayvan deneyleri süreci Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

### Deneysel Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Çalışmada, 24 adet 8-10 haftalık 200-300 g ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, deneysel süreçte yaklaşık

olarak  $20 \pm 2$  °C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ad-libitum olarak beslendi.

Çalışmada kullanılan sıçanlar her grupta 8 sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı.

**SHAM Grubu (n=8):** Bu gruba SHAM SAK modeli yapıldı. Sıçanlara PST içermeyen taşıyıcı solüsyon intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı.

**SAK Grubu (n=8):** SAK modeli oluşturuldu. Kuyruktan 120 µL heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan alındı ve prekiyazmatik sisternaya 10 saniye sürede enjekte edildi. Sıçanlara piseatannol içermeyen taşıyıcı solüsyon i.p. yolla uygulandı.

**PST Grubu (n=8):** SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra 30 mg/kg dozunda PST (%2'lik etanol içeren distile su içerisinde çözündürülerek) i.p. yolla enjekte edildi.

### Piseatannol Çözeltisi Hazırlanması ve Uygulanması

Sıçanların ağırlıklarına göre belirlenen PST (Cayman Chemical; Cat. no: 10083-24-6) dozu her hayvan için ayrı bir ependorf tüpe konuldu. İlk olarak %99'lük etanol içinde çözündürüldü ve daha sonra distile su ile seyreltildi. Taşıyıcı çözeltinin nihai etanol konsantrasyonu %2 olarak belirlendi. Çözelti enjeksiyondan hemen önce hazırlandı ve taze olarak SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra intraperitoneal yolla 30 mg/kg dozunda uygulandı. SHAM ve SAK grubuna PST içermeyen taşıyıcı solüsyon aynı yolla ve aynı saatlerde enjekte edildi.

### Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması

SAK modeli için ilk olarak genel anestezide (60-80 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür) alınan sıçanların kafatasının ön bölgesi tıraş edildi. Kuyruk vertikal insizyon ile açıldı ve kuyruktan 120 µL arteriyel kan alındı. Frontal bölge vertikal insizyon ile deri ve kaslar açılarak bregma kemik bileşkesine ulaşıldı. Stereotaksi cihazı kullanılarak iğne sagittal düzlemin 2 mm sağına 30 derece yatırıldı ve 1,5 mm çapındaki burr deliği ile orta hatta bregmanın 7 mm önüne yerleştirildi. 120 µL heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan, 30 G'lik bir iğne ile prekiyazmatik sisternaya 10 saniyede enjekte edildi. İnsizyon bölgesi dikildi ve kapatıldı.

SHAM grubunda SAK modelinin tüm aşamaları gerçekleştirildi, prekiyazmatik sisterna'ya 30 G'lik bir iğne ile girildi, 10 saniye bekledi fakat herhangi bir kan enjeksiyonu yapılmadı<sup>24</sup>.

### Nörodavranışsal Değerlendirme

Tüm sıçanlar deneysel uygulamalara başlanılmadan 1 gün önce nörolojik testlere tabi tutuldu. Aynı testler SAK sonrası 24. saatte tekrarlandı. Bu amaçla Garcia nörolojik muayenesi yapıldı.

### Garcia Nörolojik Skorunun Belirlenmesi

Nörolojik ve duyuşal fonksiyonların değerlendirilmesi amacı ile Garcia'nın geliştirdiği ölçek kullanıldı. Bu amaçla yapılan skora SAK'tan 24 saat önce ve 24 saat sonra hayvanların hangi grupta olduğunu bilmeyen iki gözlemci tarafından gerçekleştirildi<sup>25</sup>.

Skorlamada spontan aktivite (0-3 puan), dört uzuv hareketinde simetri (0-3 puan), ön pençe uzatma (0-3 puan), tırmanma (1-3 puan), vücut propriosepsiyonu (1-3 puan) ve titreşim duyuşu (1-3 puan) olmak üzere altı test toplam skor 3 ile 18 arasında olmak üzere değerlendirildi.

### Ötenazi ve Örneklerin Toplanması

Çalışma sonunda (SAK sonrası 24. saatte) tüm sıçanlar anestezide altında servikal dislokasyon işlemi ile ötenazi edildi ve frontal korteksleri soğuk buz bloğu üstünde hızlı bir şekilde çıkarıldı. Her grupta mevcut 8 hayvanın 3'ünün total beyin dokusu beyin ödemi belirlenmesi için kullanıldı. Diğer 5 hayvanın beyin dokuları histopatolojik ve genetik incelemeler için kullanıldı. Genetik incelemeler için alınan beyin dokuları analiz edilene kadar -80 °C'de saklandı. Histopatolojik incelemeler için alınan beyin dokuları ise analizler için %4'lük formaldehite konuldu.

### Beyin Ödemi Tayini

Beyin ödemi belirlemek için total beyinlerin hızlı bir şekilde ıslak ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra +70 °C'de 72 saat süre ile etüvde tutuldu. 72 saat sonrasında doku parçaları etüvden çıkarıldı ve kuru ağırlıkları ölçüldü. Islak ve kuru ağırlık oranı (%) olarak belirlendi<sup>26</sup>.

Beyin Sıvı İçeriği=[(Islak Ağırlık - Kuru Ağırlık) / Islak Ağırlık] x %100

### Genetik Analizler

#### Total RNA İzolasyonu

Genetik analizler frontal korteks dokusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak 25-30 mg'lık frontal korteks örnekleri homojenize edildi. PURE Link RNA MiniKit kullanılarak homojenatlardan total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini NanoDrop Spektrofotometre ile belirlendi ve saflık oranı 1,8-2,1 arası değerler arasında belirlenen örnekler cDNA eldesi için kullanılabilir kabul edildi. Elde edilen RNA'lar kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı<sup>27</sup>.

#### cDNA Eldesi

cDNA eldesi kit prosedürüne göre yapıldı (High Capacity cDNA Reverser Transcription Kit, ABD). Elde edilen cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında çalışıldı (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler 96-Well PCR).

## Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

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

qRT-PCR yönteminde gen ekspresyon seviyelerine bakılan GRP78, PERK, ATF4, CHOP (C/EBP homolog protein), p53 (tümör protein 53) ve NF-κB (nükleer faktör kappa b) genleri için normalizasyon yapıldı. Normalizasyon için β-actin kullanıldı.

## Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirmeler için frontal korteks doku örnekleri ilk olarak %4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri kasetlere konularak akan bir su altında 2 saat boyunca yıkandı. Dokulardan suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde sırasıyla alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 ve %100) geçirildi. Daha sonrasında dokular parlatılmak için ksilolden geçirildi ve parafine gömüldü. Kesitlere rutin hematoksilin-eozin (HE) boyama prosedürü uygulandı ve boyanan kesitler hücresel piknoz ve ödem açısından mikroskop altında (x100) HE boyama kriterlerine göre skorlandı. Skorlamada Derece 0 (bulgu yok), Derece 1 (hafif), Derece 2 (orta), Derece 3 (şiddetli) ve Derece 4 (ciddi şiddete) olmak üzere 5 farklı derecelendirme kullanılarak yapıldı.

## TUNEL Analizi

TUNEL analizi parafin bloklarından lamlara alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler üzerinden gerçekleştirildi. Bu amaçla sırası ile, deparafinasyon, rehidratasyon, endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmesi, pozitif hücrelerin belirlenmesi için amacıyla DAB (diaminobenzidin) kromojen boyama işlemleri kahverengi boyalı hücreler apoptotik olarak kabul edilerek apoptotik indeks (AI) hesaplandı. Hesaplama için "AI = (apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısı) × 100" formülü kullanıldı.

## İstatistiksel Analiz

Çalışmada gen ekspresyon düzeylerindeki değişimleri belirlemek için ilk önce qRT-PCR analizinden CP (crossing points) değerleri elde edildi. Elde edilen sonuçlar β-aktine göre normalize edildi ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü kullanılarak gen ekspresyon düzeyleri hesaplandı<sup>28</sup>.

Diğer verilerin istatistiksel anlam düzeyleri IBM SPSS 26 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Çoklu grup karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma

ise Mann-Whitney U testi ile yapıldı. P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

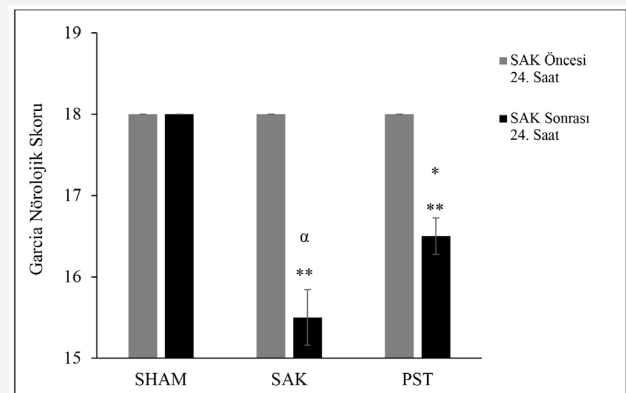
Bu çalışma her grupta 8 hayvan olacak şekilde 24 adet sıçan üzerinden gerçekleştirildi. Deney boyunca gruplarda ölüm gözlenmedi. SAK uygulanan sıçanlarda subaraknoid bölgede şiddetli kanama bulgularına rastlandı. PST grubunda ise subaraknoid bölgede kanamanın azaldığı gözlemlendi. Kanama düzeylerine yönelik herhangi bir hesaplama yapılmadı. Sadece gözlemsel olarak kanamanın varlığı, azlığı veya çokluğu değerlendirildi. Beyin ödemi verileri SHAM grubunda %77,1 SAK grubunda 77,8 ve PST grubunda ise 77,5 olarak belirlendi. Beyin ödemi bulguları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

## Garcia Skorlaması

Garcia nörolojik muayenesi ile sıçanların nörolojik fonksiyonları değerlendirildi. SAK öncesi 24. saatte yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p>0,05). Bununla birlikte SAK sonrası 24. saat verilerinin SAK ve SAK+PST grubunda anlamlı düzeyde değiştiği gözlemlendi (Şekil 1).

## Endoplazmik Retikulum Stresi Gen Ekspresyonu Düzeylerindeki Değişimler

ERS'deki SAK sonrası 24. saatteki değişimler ile bu değişimler üzerine PST'nin etkilerini ortaya koymak için çalışmamızda GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gen ekspresyonu düzeyleri incelenmiştir. Bunlardan PERK gen ekspresyon düzeylerinde



Şekil 1. Garcia nörolojik skorlaması verilerinin karşılaştırılması

\*SAK grubu istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05).

\*\*SHAM grubu istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).

α: Grup içinde istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).



anlamli bir değişiklik gözlemlenmezken GRP78, ATF4 ve CHOP gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler ortaya çıkmıştır ( $p<0,05$  veya  $p<0,01$ ; Şekil 2a-2d).

### p53 ve NF- $\kappa$ B Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Çalışma sonuçları p53 mRNA seviyelerinin SAK grubunda dramatik bir şekilde arttığını ve PST'nin bu artışı güçlü bir şekilde azalttığını göstermiştir ( $p<0,01$ ). Bununla birlikte NF- $\kappa$ B gen ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 3a-3b).

### Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları

Frontal korteks doku örnekleri HE boyama ile hücrel piknoz ve ödem açısından değerlendirildi. SHAM grubunda hücrel

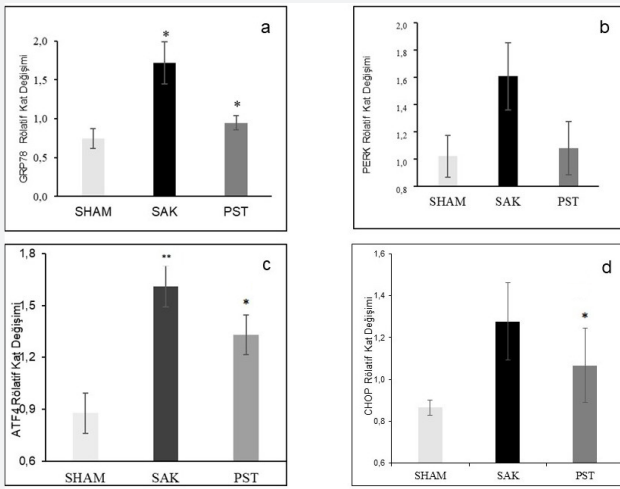
piknoz ve ödem bulgusuna rastlanmadı. Hücrel piknoz ve ödem parametrelerinin hem SAK (her iki parametre için  $p<0,001$ ) hem PST (piknoz:  $p<0,01$ ; ödem:  $p<0,001$ ) grubunda SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi. Gruplara ait HE boyama örnekleri Şekil 4a-4c'de, bu değişikliklere ait skorlama bulguları ve istatistiksel önem düzeyleri ise Şekil 5a ve 5b'de gösterilmiştir.

### TUNEL Analizi Bulguları

TUNEL analizi yöntemi ile apoptotik hücre sayıları belirlendi. Elde edilen verilere göre hem SAK hem de PST grubunda SHAM grubuna göre TUNEL pozitif hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu anlaşıldı (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p=0,05$ ). PST tedavisi SAK sonrası artan apoptotik hücre sayısında anlamlı azalmalar göstermiştir (Şekil 6a-6d).

### TARTIŞMA

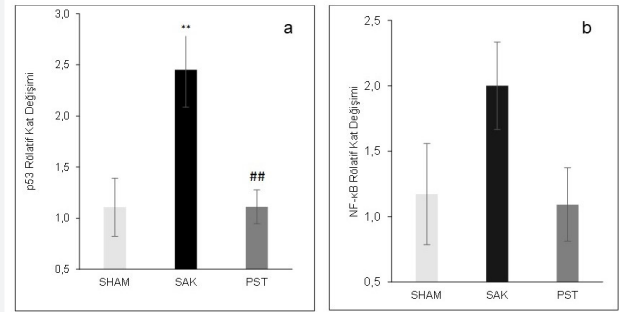
Bu çalışma ile deneysel SAK modeli oluşturulan sıçanlarda frontal korteksteki ERS üzerine PST'nin iyileştirici etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. SAK sonrası 60. dakikada PST uygulamasının a) Garcia nörolojik skorunda iyileşmeye



Şekil 2. Endoplazmik retikulum stresinde görevli olan (a) GRP78, (b) PERK, (c) ATF4 ve (d) CHOP genlerinin rölatif kat değişimi

\*SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı  $p<0,05$ .

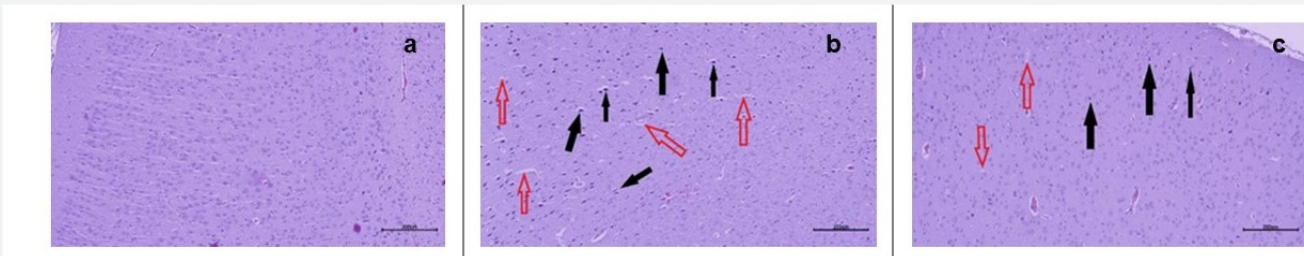
\*\*SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı  $p=0,01$ .



Şekil 3. p(a) p53 ve (b) NF- $\kappa$ B rölatif kat değişimi. ( $p>0,05$ )

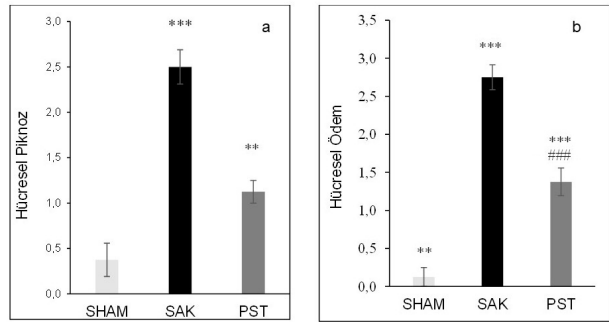
\*\*SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı.

##SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ).



Şekil 4. (a) SHAM, (b) SAK ve (c) PST grubu frontal korteks doku örnekleri HE bulguları. Kırmızı oklar ile ödem alanları, siyah oklar ile de hücrel piknoz göstermektedir. (HE, 100x)

b) GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gibi ERS'yi gösteren gen ekspresyon düzeylerinde azalmaya, c) apoptoz ve yangıyı gösteren p53 ve NF- $\kappa$ B gen ekspresyonu seviyelerinde azalmaya d) histopatolojik düzeyde piknoz ve ödem skorunda düzelmeye ve (e) TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısında ise azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar SAK sonrası PST uygulamasının SAK'a bağlı ERS'yi iyileştirebileceğini ve hücre hasarını azaltabileceğini gösteren ilk deneysel bulgulardır.

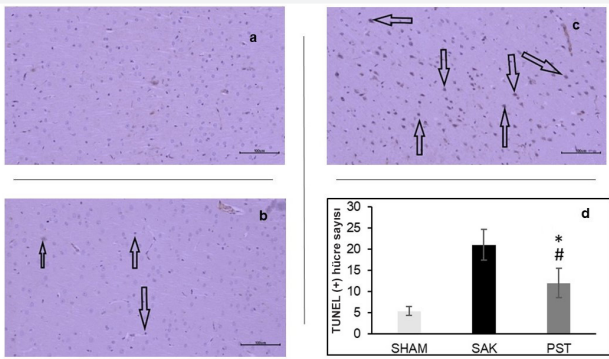


**Şekil 5.** HE boyama ile (a) piknoz ve (b) ödem parametrelerinin değerlendirilmesi.

\*\*SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ).

\*\*\*SHAM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ).

###SAK grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ).



**Şekil 6.** (a) SHAM, (b) SAK ve (c) PST apoptotik hücre görüntüleri (TUNEL, 200x). Siyah oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. (d) AI indekse göre TUNEL (+) hücre sayısı.

\*SAK grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,05$ ).

\*\*SHAM grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ).

#SHAM grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,05$ ).

Çalışmamızda Prunell ve ark.'ndan<sup>24</sup> (2003) modifiye edilen SAK modeli uygulandı. Deneysel çalışma sonucunda hayvanların beyin dokuları çıkarıldıktan sonra tüm sıçanlar subaraknoid alanda kan birikimi olup olmadığı yönü ile kontrol edildi. Hem bu gözlem bulguları, hem nörolojik skor verileri hem de genetik ve histopatolojik veriler uyguladığımız SAK modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın ıslak/kuru beyin ağırlığı oranı verileri ile literatür verileri arasında farklılık olduğu görülmüştür. Xiong ve ark.<sup>29</sup> (2020) SAK modeli oluşturduktan 48 saat sonra sıçanların beyin dokusunu çıkarıp 100 °C'de 48 saat kurutup ıslak/kuru beyin oranını belirlemişlerdir. Çalışma ıslak/kuru beyin oranının SAK grubunda arttığını L-sistein uygulamasının beyin ödemi azalttığını göstermiştir (Xiong ve ark., 2020)<sup>29</sup>. Yan ve ark.'nın<sup>30</sup> (2017) yaptığı çalışmada ise SAK sonrası 72. saatte beyin dokusu çıkarılıp 4 bölüme ayrılmıştır. Her bölüm ayrı ayrı 105 °C'de 72 saat kurutulduktan sonra beyin ödemi ıslak/kuru beyin oran formülü kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmacılar SAK modeliyle bu oranın arttığını göstermiştir<sup>30</sup>. Qi ve ark.'nın<sup>31</sup> (2018) yapmış olduğu çalışmada ise sıçanların beyin dokuları SAK sonrası 24. saatte çıkarılmış ve 105 °C'de 24 saat kurutulmuş beyin ödemi oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Bu çalışma ile de beyin ödeminin SAK ile arttığı, atorvastatin verilmesinin beyin ödemi azaltıcı etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da en yüksek ıslak/kuru beyin oranı SAK grubunda belirlenmiş ve PST uygulaması bu oranı azaltıcı etki göstermiştir. Ancak elde edilen veriler açısından gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark ortaya çıkmamıştır. Bunun nedeni uygulanan kan miktarının azlığı olabileceği gibi beyin ödemi verilerinin sadece 3 sıçanda kaydedilmiş olması da olabilir. Diğer taraftan SAK grubundaki beyin dokusu örneklerinde histopatolojik düzeyde ödem tespit ettik. Bu sonuçlar uyguladığımız SAK modelinin histopatolojik düzeyde beyin ödeme yol açtığını ancak total beyin su miktarında anlamlı bir artış yapacak kadar şiddetli olmadığını düşündürmüştür.

Çalışmada SAK modeli oluşturulmadan önce tüm sıçanların nörodavranışsal test bulguları kaydedildi ve SAK sonrası 24. saat verileri ile karşılaştırıldı. Bu amaçla Garcia nörolojik muayene skorları belirlendi. Garcia nörolojik skorları açısından SAK öncesi tüm sıçanların skorları 18 olarak belirlendi. SAK grubunda 24. saatte bu skor 15,5 değerine kadar azaldı. PST uygulanan SAK grubunda ise 16,5 olarak belirlendi. Bu sonuçlar PST uygulamasının SAK sonrası kötüleşen Garcia nörolojik skorunu iyileştirdiğini göstermektedir (Şekil 1). SAK sonrası nörolojik skor kayıtları hemen hemen tüm SAK çalışmalarında belirlenmektedir. Nörolojik skorlardaki bozulma düzeyi hem SAK'ın ortaya çıkıp çıkmadığı hakkında hem de SAK'ın düzeyi hakkında bilgi vermektedir. Diğer taraftan SAK'ta koruyucu veya tedavi edici ajanların nörolojik skorlar üzerine etkileri de incelenmektedir. SAK sonrası nörolojik skor verileri genellikle

24. saatte kaydedilir. Çünkü en anlamlı değişiklikler bu saatte meydana gelir. Tian ve ark.<sup>32</sup> (2020) SAK modeli oluşturdukları sıçanlarda Garcia skorlarını 3., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde belirlemişler ve en düşük skoru 24. saatte ölçmüşlerdir. Çalışmalarında 6. saatte azalmaya başlayan Garcia skoru 24. saatte 10 değerine kadar azalmış ve sonra tekrar yükselmeye başlamıştır. Garcia skorundaki bu azalmanın bu saatte ortaya çıkan nöronal apoptoza bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Garcia skorunun en düşük olduğu SAK grubunun en yüksek frontal korteks apoptotik hücre sayısına sahip olduğunu belirledik.

SAK sonrası 24-72. saatlerde beyinde gerçekleşen patolojik olaylar EBH şeklinde tanımlanmaktadır. EBH'nin altında yatan en önemli mekanizma ise nöronal apoptozdur. Nöronal apoptoz SAK sonrası ortaya çıkan nörolojik bozulmaların ve işlev kayıpların ana sorumlusu olarak kabul edilir. Birçok mekanizmanın nöronal apoptoza uyardığı bilinmektedir. Bunlar arasında ROS artması, eksitotoksisite, sinaptik disfonksiyon, bozulmuş protein yıkım sistemleri, ERS, DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve enflamasyon sayılabilir<sup>33</sup>. Bu faktörlerden bir tanesi olan ERS son yıllarda SAK sonrası ortaya çıkan nöronal apoptozla ilişkilendirilmiştir. ER işlevlerindeki bozulma katlanmamış proteinlerin birikimine ve sonuç olarak ERS'ye sebep olur. ERS, UPR yolağının aktifleşmesine yol açar. UPR ise PERK ve ATF4 gibi ERS'ye duyarlı proteinleri aktive eder. PERK'in aktivasyonu ER kaynaklı şaperon ve sitokinlerin aktivasyonunu uyarır. Orta düzeyde bir ERS hücrenin hayatta kalmasına yol açarken, ileri düzeyde ve süreklilik arz eden ERS sinir hücresi ölümüne sebep olur. Nakka ve ark.<sup>17</sup> (2016) yaptıkları bir çalışmada, ERS'nin iskemi/reperfüzyona bağlı sinir hücre ölümlerinde rol aldığını göstermişlerdir. Çalışmalarında iskemi/reperfüzyon sonrası beyin dokusunda GRP78, CHOP ve ATF4 gen ekspresyon seviyelerinin arttığını ve yüksek düzeyde nöronal hasar ortaya çıktığını belirlediler. UPR'yi azaltmak için seçici bir eIF2 $\alpha$  inhibitörü olan salubrinin uyguladıklarında ise nöronal hücre ölümünde anlamlı şekilde azalmalar ortaya çıkmıştır. Başka bir çalışmada ise zonisamidin ERS üzerinden nöronal hücre ölümünü azaltıcı etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Parkinson modeli oluşturulan sıçanlarda zonisamidin CHOP ve kaspaz-3 üzerinden ERS'yi azalttığını ve nöronal hasarı engellediğini ortaya koymuştur<sup>34</sup>.

Nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra SAK sonrası artan ERS de nöronal hücre ölümleri ile ilişkilendirilmiştir. Jiang ve ark.<sup>35</sup> (2021) sıçanlarda serebral korteks dokusunda SAK sonrası GRP78, CHOP ve kaspaz-12 gen ekspresyon düzeylerinin arttığını böylelikle nöronal hücre ölümünün de arttığını göstermişlerdir. Hidrojence zengin serum fizyolojik verilen sıçanlarda nöronal apoptozun iyileştiğini gösteren bulgular vardır. Tian ve ark.<sup>32</sup> (2020) ise yaptıkları bir çalışma SAK sonrası 24. saate TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısının arttığını göstermiştir. Araştırmacılar nöronal apoptozdaki artışa GRP78,

CHOP, kaspaz-12 ve ASK1 gen ekspresyon düzeylerindeki artışların neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da SAK sonrası ERS'nin göstergesi olan GRP78, PERK, ATF4 ve CHOP gen ekspresyonu düzeylerinde artışlar ortaya çıkmış ve PST uygulaması bu artışlara karşı iyileştirici etki göstermiştir. ERS göstergelerinin arttığı gruplarda hem p53 ile NF- $\kappa$ B hem de apoptotik sinir hücre sayılarının da artmış olduğunu gözlemledik. Bu bulgular literatür bildirimlerine paralel olarak SAK sonrası artan ERS'nin nöronal apoptoza tetiklediğini göstermektedir. PST uygulaması ERS'yi azaltarak nöronal hasarda iyileştirici bir etki göstermiştir.

Çalışmamızda enflamatuvar süreçlerdeki değişimleri gösterebilecek bir parametre olarak NF- $\kappa$ B gen ekspresyonları incelenmiştir. SAK sonrası artan NF- $\kappa$ B gen ekspresyonu düzeylerinin PST uyguladığımız grupta yaklaşık %50 düzeyinde azalmış olması PST'nin enflamatuvar süreçleri inhibe ettiğini düşündürmüştür. PST'nin NF- $\kappa$ B'yi inhibe edici etkisi bir çalışmada ortaya konulmuştur<sup>36</sup>. Çalışma sonuçlarına göre PST'nin beyin dokusunda ortaya çıkan ve beyin hasarına karşı koruyucu olduğu düşünülen antioksidan ve anti-enflamatuvar etkilerinin NF- $\kappa$ B inhibisyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmada, PST'nin beyin hücreleri üzerine etkisi lipopolisakkaritle indüklenen enflamasyonda incelenmiştir. *In vitro* düzeyde yürütülen ve PST'nin KBB'deki bozulmayı azaltarak beyni hasara karşı koruyucu etki gösterebileceği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise PST'nin beyinde iskemi/reperfüzyon modelinde koruyucu etkileri incelenmiştir<sup>37</sup>. PST bir SIRT1 aktivatörü olarak bilinir. SIRT1'in aktivasyonu ise antioksidan ve antiapoptotik faktörlerin sentezini uyararak hücreleri hasara karşı korur<sup>38,39</sup>. Çalışma sonuçlarından yola çıkılarak beyin iskemi/reperfüzyon modelinde PST'nin gösterdiği antioksidan ve anti-enflamatuvar etkiler SIRT1 aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir<sup>37</sup>. PST beyin hasarı üzerine koruyucu etki gösterdiğine dair yukarıda verilen çalışmalar bulunmakla birlikte PST'nin SAK'taki etkilerini inceleyen sadece bir adet çalışmaya rastlanılmıştır. Bununla birlikte PST bir RES analogu olarak bilinir ve RES'in hem beyin hasarı hem de SAK'taki rolü konusunda çalışmalar bulunmaktadır. RES'in SAK modelinde hem çok yüksek hem de düşük dozda uygulandığı bir çalışmada antiapoptotik etkisinin ancak yüksek dozda ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Çalışmada RES bu etkisini Akt yolağını inhibe ederek göstermiştir<sup>40</sup>. Başka bir çalışmada ise RES, SAK sonrası artan oksidatif stresle birlikte ERS'yi de azaltıcı etki göstermiştir<sup>41</sup>. Çalışmada RES'in etkisi bizim çalışmamıza benzer şekilde prefrontal kortekste incelenmiştir. RES SAK sonrası artan CHOP ve GRP78 düzeylerini anlamlı şekilde azaltıcı etki göstermiştir. SAK'ta artan ROS birikimi ERS'ye ve apoptoza giden süreçleri tetikler. Bir antioksidan olan RES bu özelliği sayesinde ERS'yi azaltıcı etki gösterir. Çalışmamızda RES'e benzer şekilde PST'nin de SAK sonrası artan ERS göstergelerinden CHOP, GRP78, ATF4 ve PERK gen ekspresyon

düzeylerini azalttığı anlaşılmıştır. PST aynı zamanda TUNEL pozitif hücre sayılarında da azalmaya sebep olmuştur. Bu veri PST'nin SAK'a bağlı apoptozu da azalttığını göstermektedir.

### Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızda gen ekspresyonlarını belirlediğimiz belirteçlerin protein düzeyleri hesaplanmamıştır. Ayrıca etik kurallar nedeni ile beyin ödemi için sadece 3 sıçan kullanılmıştır.

### SONUÇ

Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar PST'nin SAK sonrası bozulan nörolojik skorları düzelttiğini, apoptozu azalttığını ve ERS'deki bozulmaya karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, SAK sonrası artan ERS üzerine PST'nin koruyucu etki gösterdiğine dair ortaya konulan ilk bulgulardır. Bu bulgulardan yola çıkarak, SAK tedavisinde PST'nin bir adjuvant ajan olarak kullanım potansiyeli olduğu söylenebilir. Bununla birlikte altta yatan diğer mekanizmaların da ortaya konulması için yeni çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

### Etik

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.03.2021 tarih ve 2021/02-08 sayılı izni ile yürütüldü.

**Hasta Onayı:** Hayvan deneyidir.

### Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama - Konsept - Dizayn - Veri Toplama veya İşleme - Analiz veya Yorumlama - Literatür Arama - Yazan: B.Ö., M.U.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Çalışma "Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı" tarafından TYL-2021-3611 no'lu proje ile desteklenmiştir

### KAYNAKLAR

1. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:1365-72.
2. Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke*. 1998;29:251-6.
3. Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1341-53.
4. He Y, Xu L, Li B, Guo ZN, Hu Q, Guo Z, et al. Macrophage-Inducible C-Type Lectin/Spleen Tyrosine Kinase Signaling Pathway Contributes to Neuroinflammation After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Stroke*. 2015;46:2277-86.
5. Paschen W, Mengesdorf T. Cellular abnormalities linked to endoplasmic reticulum dysfunction in cerebrovascular disease--therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2005;108:362-75.

6. Cnop M, Fougere F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012;18:59-68.
7. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:579-92.
8. Tatar M, Tatar T. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2019;41:294-303.
9. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107:881-91.
10. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016;529:326-35.
11. Chambers JE, Marciniak SJ. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;307:C657-70.
12. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115:2656-64.
13. Wen J, Lin H, Zhao M, Tao L, Yang Y, Xu X, et al. Piceatannol attenuates D-GalN/LPS-induced hepatotoxicity in mice: Involvement of ER stress, inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol*. 2018;64:131-9.
14. Xu W, Gao L, Li T, Zheng J, Shao A, Zhang J. Apelin-13 Alleviates Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage via Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis and Blood-Brain Barrier Disruption: Possible Involvement of ATF6/CHOP Pathway. *Neuroscience*. 2018;388:284-96.
15. van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis*. 2009;14:1424-34.
16. Ayer RE, Zhang JH. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;104:33-41.
17. Nakka VP, Prakash-Babu P, Vemuganti R. Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress, and Autophagy: Potential Therapeutic Targets for Acute CNS Injuries. *Mol Neurobiol*. 2016;53:532-44.
18. Sundström J, Söderholm M, Söderberg S, Alfredsson L, Andersson M, Bellocco R, et al. Risk factors for subarachnoid haemorrhage: a nationwide cohort of 950 000 adults. *Int J Epidemiol*. 2019;48:2018-25.
19. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem*. 2012;130:797-813.
20. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol*. 2012;7:979-90.
21. Mikulski D, Górniak R, Molski M. A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. *Eur J Med Chem*. 2010;45:1015-27.
22. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res*. 2012;750:60-82.
23. Kil JS, Jeong SO, Chung HT, Pae HO. Piceatannol attenuates homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and endothelial cell damage via heme oxygenase-1 expression. *Amino Acids*. 2016;49:735-45.
24. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, Svendgaard NA. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery*. 2003;52:165-75.
25. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26:627-34.
26. Ding K, Xu J, Wang H, Zhang L, Wu Y, Li T. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int*. 2015;91:46-54.



27. Ovali MA, Uzun M. The effects of melatonin administration on KCNQ and KCNH2 gene expressions and QTc interval in pinealectomised rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017;63:45-50.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
29. Xiong Y, Xin DQ, Hu Q, Wang LX, Qiu J, Yuan HT, et al. Neuroprotective mechanism of L-cysteine after subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen Res*. 2020;15:1920-30.
30. Yan F, Cao S, Li J, Dixon B, Yu X, Chen J, et al. Pharmacological Inhibition of PERK Attenuates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Rats Through the Activation of Akt. *Mol Neurobiol*. 2017;54:1808-17.
31. Qi W, Cao D, Li Y, Peng A, Wang Y, Gao K, et al. Atorvastatin ameliorates early brain injury through inhibition of apoptosis and ER stress in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Biosci Rep*. 2018;38:BSR20171035.
32. Tian XS, Xu H, He XJ, Li Y, He B, Zhao D. Endoplasmic reticulum stress mediates cortical neuron apoptosis after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13:1569-77.
33. Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3082.
34. Tsujii S, Ishisaka M, Shimazawa M, Hashizume T, Hara H. Zonisamide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell damage in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2015;746:301-7.
35. Jiang B, Li Y, Dai W, Wu A, Wu H, Mao D. Hydrogen-rich saline alleviates early brain injury through regulating of ER stress and autophagy after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Cir Bras*. 2021;36:e360804.
36. Zhou Y, Khan H, Hoi MPM, Cheang WS. Piceatannol Protects Brain Endothelial Cell Line (bEnd.3) against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress. *Molecules*. 2022;27:1206.
37. Wang KJ, Zhang WQ, Liu JJ, Cui Y, Cui JZ. Piceatannol protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via the Sirt1/FoxO1 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2020;22:5399-411.
38. Lee HJ, Kang MG, Cha HY, Kim YM, Lim Y, Yang SJ. Effects of Piceatannol and Resveratrol on Sirtuins and Hepatic Inflammation in High-Fat Diet-Fed Mice. *J Med Food*. 2019;22:833-40.
39. Llarena M, Andrade F, Hasnaoui M, Portillo MP, Pérez-Matute P, Arbones-Mainar JM, et al. Potential renoprotective effects of piceatannol in ameliorating the early-stage nephropathy associated with obesity in obese Zucker rats. *J Physiol Biochem*. 2016;72:555-66.
40. Zhou XM, Zhou ML, Zhang XS, Zhuang Z, Li T, Shi JX, et al. Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model. *J Surg Res*. 2014;189:159-65.
41. Xie YK, Zhou X, Yuan HT, Qiu J, Xin DQ, Chu XL, Wang DC, Wang Z. Resveratrol reduces brain injury after subarachnoid hemorrhage by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Neural Regen Res*. 2019;14:1734-42.