



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**CDNF VE MANF NÖROTROFİK FAKTÖRLERİNİN İSKEMİ  
SONRASI BEYİN PLASTİSİTESİ VE ONARIMI ÜZERİNE  
OLAN ETKİLERİ**

AHMET BURAK ÇAĞLAYAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2017

## TEŞEKKÜR

Bu tezdeki tüm deneyleri yapabilmemi, sonuçları değerlendirebilmemi ve yazabilmemi sağlayan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Danışman hocam olmadan, deneyleri başarıyla tamamlayabilmem, değerlendirebilmem ve yazabilmem mümkün değildi. Sadece bilimsel olarak değil hayatın birçok yönünde ve en önemlisi ayağım takıldığında beni kaldıran, morallendiren sayın hocama saygılarımı sunuyorum.

Ayrıca tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Gürkan Öztürk ve Prof. Dr. Ülkan Kılıç'ın yardımları, yol göstermeleri ve eleştirileri olmadan bu tezi tamamlayamazdım.

Tez ile ilgili olsun olmasın, bilimsel olsun olmasın, her türlü konuda, her ihtiyacım olduğunda ve çoğu zaman daha ihtiyacım ortaya çıkmadan yanımda olan, destek olan Mustafa Çağlar Beker, Berrak Çağlayan, Taha Keleştemur ve Esra Yalçın'a teşekkür ederim. Kılıç laboratuvarında çalışan başta Serdar Altunay, Aysun Dilden, Elif Sertel, Arman Dalay, Reyda Karaçay olmak üzere tüm ekibe teker teker teşekkür ediyorum. Her birinden ayrı ayrı şeyler öğrendiğimi itiraf ediyorum.

İstanbul Medipol Üniversitesi REMER bünyesinde çalışan Hilmi Kaan Alkan ve Neşe Ayşit Altuncu, MEDİTAM bünyesinde çalışan Ali Şenbahçe ve Musa Ekrem Özdemir olmak üzere tezin birçok aşamasında yardımcı olan, fikir alışverişinde bulunduğum herkese teşekkür ederim.

Bu süreçte yardımlarını eksik etmeyen ve güvendiklerini belli eden aileme ayrıca teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

<b>TEZ ONAYI</b> .....	i
<b>BEYAN</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b> .....	viii
<b>TABLoların LİSTESİ</b> .....	x
<b>1- ÖZET</b> .....	1
<b>2- ABSTRACT</b> .....	3
<b>3-GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	4
<b>4-GENEL BİLGİLER</b> .....	5
4.1. İskemik beyin felcinin patofizyolojisi.....	5
4.1.1. Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite.....	7
4.1.2. Oksidatif stres.....	8
4.1.3. Enflamasyon.....	8
4.1.4. Yayılan depresyon.....	9
4.1.5. Hücre ölüm çeşitleri; apoptoz, nekroz ve otofaji.....	9
4.2. Beyin felcinde muhtemel klinik tedaviler ve tedavide karşılaşılan zorluklar.....	12
4.2.1. Doku plazminojen aktivatörü (t-PA).....	12
4.2.2. Oksijen tedavisi.....	12
4.2.3. Hipotermi.....	14
4.2.4. Serebral kollateral kanlanma.....	14
4.2.5. Zamanlama.....	15
4.2.6. Yaş ve diğer hastalıklar.....	15
4.2.7. İnsan ve deney hayvanları arasındaki morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar.....	16
4.2.8. İlaçların yan etkileri.....	16

4.3.	Fonksiyonel geri kazanım.....	16
4.4.	Plastisite.....	18
4.4.1.	Efrin Reseptörleri, Efrin A5 ve Efrin B1 .....	18
4.4.2.	Netrin-1.....	19
4.4.3.	Büyüme ile İlgili Protein 43 (GAP43).....	19
4.5.	Nörotrofik faktörler .....	20
4.5.1.	Beyin-Kökenli Nörotrofik Faktör (BKNF, <i>BDNF</i> ).....	20
4.5.2.	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEBF, <i>VEGF</i> ).....	20
4.5.3.	Siliyer Nörotrofik Faktör (SNF, <i>CDTF</i> ).....	21
4.5.4.	Mezensefalik Astrosit-türevli Nörotrofik Faktör (MANF) .....	21
4.5.5.	Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (SDNF, <i>CDNF</i> ).....	23
<b>5-</b>	<b>MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>25</b>
5.1.	Deney dizaynı ve deneysel gruplar.....	25
5.2.	Orta serebral arter oklüzyonu ve ozmotik pompa yerleştirme .....	26
5.3.	Deneyin sonlandırılması ve beyinden örnek alınması.....	26
5.4.	İmmünohistokimya çalışmaları .....	27
5.5.	Hücre içi sinyal yolları ile ilgili proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle belirlenmesi .....	30
5.6.	qPCR yöntemi ile gen miktarındaki değişikliklerin belirlenmesi .....	32
5.7.	Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili testler .....	35
5.8.	Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın belirlenmesi.....	37
5.9.	İstatistik .....	38
<b>6-</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
6.1.	Serebral kan akımının ölçülmesi .....	39
6.2.	Apoptotik hücre sayısının değerlendirilmesi.....	40
6.3.	İskemi sonrası uzun dönemde atrofinin belirlenmesi.....	41
6.4.	Nörogenez belirlenmesi.....	42
6.5.	Gliogenezin belirlenmesi.....	43
6.6.	Glial yarının belirlenmesi .....	44
6.7.	İskemi sonrası protein seviyesindeki değişiklikler .....	45
6.8.	İskemi sonrası gen ekspresyon değişiklikler .....	58

6.9. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili davranış testleri.....	76
6.10. Aksonal uzama .....	83
<b>7-TARTIŞMA</b> .....	<b>85</b>
<b>8-SONUÇ</b> .....	<b>96</b>
<b>9-KAYNAKLAR</b> .....	<b>97</b>
<b>10-ETİK KURUL ONAYI</b> .....	<b>113</b>
<b>11-ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>114</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AMPA	a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BDNF	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
CDNF	Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör
CNTF	Silyer Nörotrofik Faktör
DCX	Doublecortin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FDA	Amerikan Fedaral Gıda ve İlaç İdaresi
GAP43	Büyüme ile İlgili Protein 43
GDNF	Glia-Kökenli Nörotrofik Faktör
GFAP	Glial Fibrilik Asidik Proteini
MANF	Mezensefalik Astrosit-Kökenli Nörotrofik Faktör
NCX	Sodyum Kalsiyum Değiştiricisi
NEUN	Nöronal Nükleus
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik Oksit
OSAO	Orta Serebral Arter Oklüzyonu
RAT	Reaktif Azot Türevleri
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
T-PA	Doku plazminojen aktivatörü
TRAIL	TNF-bağımlı apoptoz indükleyen ligand
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 5.1.1	Deney dizaynı .....	25
Şekil 6.1.1	Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı.....	39
Şekil 6.2.1	Zamana bağlı olarak apoptozun değerlendirilmesi.....	40
Şekil 6.3.1	Korpus kallozumdaki (A) ve striatumdaki (B) post-iskemik atrofinin <i>cresyl violet</i> boyaması yapılarak değerlendirilmesi.....	41
Şekil 6.4.1	Nöroenezin değerlendirilmesi.....	42
Şekil 6.5.1	Gliogenezin değerlendirilmesi.....	43
Şekil 6.6.1	Glial yaranın değerlendirilmesi .....	44
Şekil 6.7.1.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-Akt anlatımına etkisi .....	45
Şekil 6.7.2.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p44/-42 anlatımına etkisi.....	47
Şekil 6.7.3.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p38 anlatımına etkisi .....	49
Şekil 6.7.4.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak p21 anlatımına etkisi .....	51
Şekil 6.7.5.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak eNOS anlatımına etkisi .....	53
Şekil 6.7.6.1	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak iNOS anlatımına etkisi .....	55
Şekil 6.7.7.1.	İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Versican anlatımına etkisi.....	57
Şekil 6.9.2.1	İskemi sonrası el çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi .....	77
Şekil 6.9.3.1	İskemi sonrası motor koordinasyonun değerlendirilmesi.....	78
Şekil 6.9.4.1	İskemi sonrası anksiyetenin değerlendirilmesi.....	79
Şekil 6.9.5.1	İskemi sonrası hareketlilik süresinin değerlendirilmesi.....	80
Şekil 6.9.5.2	İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; kenar bölgesi .....	81
Şekil 6.9.5.3	İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; geçiş bölgesi .....	82

**Şekil 6.9.5.4.** İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; merkez bölge..... 83

**Şekil 6.10.1** Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın değerlendirilmesi..... 84





## TABLULARIN LİSTESİ

<b>Tablo 5.6.2.1</b> cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları.....	33
<b>Tablo 5.6.3.1</b> Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri .....	34
<b>Tablo 6.8.1.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi .....	59
<b>Tablo 6.8.1.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi .....	59
<b>Tablo 6.8.2.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi .....	60
<b>Tablo 6.8.2.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi .....	60
<b>Tablo 6.8.3.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi .....	61
<b>Tablo 6.8.3.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi .....	61
<b>Tablo 6.8.4.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi .....	62
<b>Tablo 6.8.4.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi .....	65
<b>Tablo 6.8.5.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi .....	63
<b>Tablo 6.8.5.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi .....	63
<b>Tablo 6.8.6.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi .....	64

<b>Tablo 6.8.6.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi .....	64
<b>Tablo 6.8.7.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi .....	65
<b>Tablo 6.8.7.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi .....	65
<b>Tablo 6.8.8.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi .....	66
<b>Tablo 6.8.8.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi .....	66
<b>Tablo 6.8.9.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi .....	67
<b>Tablo 6.8.9.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi .....	67
<b>Tablo 6.8.10.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi .....	68
<b>Tablo 6.8.10.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi .....	68
<b>Tablo 6.8.11.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste MANF'm gen seviyesindeki analizi .....	69
<b>Tablo 6.8.11.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste MANF'm gen seviyesindeki analizi .....	69
<b>Tablo 6.8.12.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi .....	70
<b>Tablo 6.8.12.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi .....	70

<b>Tablo 6.8.13.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi .....	71
<b>Tablo 6.8.13.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi .....	71
<b>Tablo 6.8.14.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi .....	72
<b>Tablo 6.8.14.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi .....	72
<b>Tablo 6.8.15.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Versican'm gen seviyesindeki analizi .....	73
<b>Tablo 6.8.15.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Versican'm gen seviyesindeki analizi .....	73
<b>Tablo 6.8.16.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Nörocan'in gen seviyesindeki analizi .....	74
<b>Tablo 6.8.16.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Nörocan'in gen seviyesindeki analizi .....	74
<b>Tablo 6.8.17.1</b> İpsilateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi .....	75
<b>Tablo 6.8.17.2</b> Kontralateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi .....	75

## 1. ÖZET

### CDNF VE MANF NÖROTROFİK FAKTÖRLERİNİN İSKEMİ SONRASI BEYİN PLASTİSİTESİ VE ONARIMI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Küçük protein yapıları ile nörotrofik faktörler, nöronların gelişimi sırasındaki rollerinin yanı sıra beyinde nöronların hayatta kalımı, nörogenез ve sinaptik bağlantıların korunmasında da mutlak rol oynamaktadırlar. Nörotrofik faktörlerin ifadelerindeki azalma veya bu faktörlerin yokluğu birçok nörodejeneratif hastalığın patobiyolojisinde rol oynamaktadırlar. Yapısal olarak birbirlerine benzerlikleri ile bilinen iki nörotrofik faktör olan Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (*CDNF*) ve Mezensefalik Astrosit-Kökenli Nörotrofik Faktör (*MANF*) literatürde daha önceden tanımlanmış olan nörotrofik faktörlerden farklı, benzersiz bir protein yapısına sahiptirler. Bu farklılığın, *MANF* ve *CDNF*'nin diğer nörotrofik faktörlerden farklı sinyal yollarını kullanmalarına ve bu nedenle daha önceden bilinen nörotrofik faktörlerden farklı etkilere sahip olmalarına yol açabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, yeni mekanizmaların bulunması, başta beyin felci olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabilecek potansiyele sahiptir. Bu tezde *MANF* ve *CDNF* nörotrofik faktörlerinin hasar sonrası *in vivo* şartlarda nöronal hayatta kalım, aracılık eden sinyal iletim yollarını, doku modellemesi, nörogenез, gliogenез ve piramidal trakt plastisitesi üzerine olan restoratif etkilerinin araştırılması ve aynı zamanda fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkileri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaların çalışılması amacıyla, insanlarda inme vakalarının yaklaşık % 80'inden sorumlu olan iskemik beyin felci modeli olarak farede orta serebral arter tıkanması tekniği kullanılmıştır. İskemi sonrası hem *CDNF* hem de *MANF* tedavisinin apoptotik hücre sayısını azalttığı, yeni nöron oluşumunu arttırdığı, glial yara alanını düşürdüğü, motor koordinasyon ve el çekme/kavrama gücünü arttırarak fonksiyonel geri kazanımı sağladığı ve özellikle kontralateral striatumda gen ve protein seviyesinde yaptığı değişiklikler sayesinde aksonal uzamayı arttırarak plastisiteyi sağladığı görülmüştür. Elde edilen bulguların beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Serebral İskemi, CDNF, MANF, Fonksiyonel Geri Kazanım, Aksonal Projeksiyon

Bu tez TÜBİTAK 114S402 nolu proje kapsamında yapılmıştır.



## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF NEUROTROPHIC FACTORS CDNF AND MANF ON BRAIN PLASTICITY AND REPAIR AFTER BRAIN ISCHEMIA**

Neurotrophic factors are small proteins that play essential roles in development of neurons and the maintenance of neuronal synaptic function. Decrease or absence of neurotrophic factor levels play important roles in pathobiology of several neurodegenerative disorders. Recently identified CDNF (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor) and MANF (Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor) have unique protein structures which are different than the other known neurotrophic factor families. This difference is considered to be the reason for MANF and CDNF to use distinct signaling pathways than other neurotrophic factors. To this end, elucidating the new mechanisms has the potential to offer new approaches in the treatment of neurodegenerative disorders including brain ischemia. In this project, restorative effects of MANF and CDNF on *in vivo* neuronal survival following an insult, mediating signaling pathways, tissue modelling, neurogenesis, gliogenesis and pyramidal tract plasticity were investigated and also compared with their effects on functional recovery. In order to study these mechanisms, Middle Cerebral Artery Occlusion, which is responsible for approximately 80 % of all stroke cases in humans was used. Both CDNF and MANF treatment decreased the number of apoptotic cells and glial scar, increased neurogenesis, motor coordination and grip strength, ameliorates functional recovery and regulates several protein and gene expression in the contralateral hemisphere finally axonal growth and plasticity after cerebral ischemia. With the use of this method and due to its similarity of this method with clinical stroke cases, it is expected this thesis to contribute to the identification of novel target molecules in several neurodegenerative disorders including stroke.

**Keywords:** Cerebral Ischemia, CDNF, MANF, Functional Recovery, Axonal Projection

This thesis is funded by TUBITAK 114S402 project.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin felci, Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Bununla birlikte, motor ve psikolojik fonksiyon bozukluklarına neden olarak, hastaların uzun süre bakıma ihtiyaç duymasına yol açmaktadır (1). Hasta bakımının ekonomik maliyeti, direkt ve dolaylı masrafları göz önünde bulundurulduğunda, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yıllık 50 milyar doları bulmaktadır (2). Buna karşın klinikte kullanılan tek tedavi yöntemi doku plazminojen aktivatörü uygulamasıdır. Bu uygulama ile tıkanan damarın doku plazminojen aktivatörü yardımıyla açılması hedeflenmektedir. Ancak ilk 4,5 saat içerisinde uygulanması gereken bu tedaviden akut beyin felci hastalarının yalnızca beşte biri yararlanabilmektedir (3). Bunun yanı sıra doku plazminojen aktivatörü tedavisi alabilen hastaların önemli bir kısmı, hasarın ciddiyetine bağlı olarak hayatları boyunca fonksiyonel ve psikolojik bozukluklar yaşamaktadır. Bu bağlamda, şu anki tedaviye alternatif, daha esnek ve geniş uygulama aralığına sahip klinik olarak uygulanabilir tedavilerin bulunmasına yönelik ihtiyaç önemini korumaktadır.

Bu tezde MANF ve CDFN nörotrofik faktörlerinin hasar sonrası *in vivo* şartlarda i) nöronal hayatta kalım, ii) apoptotik hücre ölümü, iii) ölüme ve hayatta kalıma aracılık eden sinyal iletim yolları, iv) doku modellemesi, nöroenez, glienez, v) piramidal trakt ve vi) fonksiyonel iyileşme üzerine olan restoratif (onarıcı) etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaları incelemek amacıyla, insanlarda beyin felci vakalarının yaklaşık % 80'inden sorumlu olan iskemik beyin felci modeli olarak farede orta serebral arter tıkanması tekniği kullanılmıştır. Farede kullanılan orta serebral arter tıkanması yöntemi klinik inme vakalarına *in vivo* olarak benzerlik gösterdiği için, bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

## 4. GENEL BİLGİLER

Dünya Kalp Federasyonu bilgilerine göre dünya çapında her yıl 15 milyon insan serebral iskemide geçirmekte, bunun sonucunda 6 milyon insan ölmekte, hayatta kalanlardan da 5 milyonu kalıcı olarak engelli kalmaktadır (4). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2016 yılında 24572 sayılı numarasıyla yayınladığı verilere göre 2016 yılında Türkiye'de ölüm sebepleri arasında yaklaşık % 40'la dolaşım sistemi hastalıkları en başta yer almaktadır. Dolaşım sistemi hastalıklarının yaklaşık % 23'ünü serebro-vasküler hastalıklar oluşturmaktadır. İskeminin şiddetine ve iskemi süresinin uzunluğuna bağlı olarak hücre ölüm hızı artmaktadır. Bu sebeple iskemi tanısı konulduktan sonra hızlı bir şekilde kan akımının tekrar sağlanması iskemi tedavisinde temel amaçtır. Bu temel amaç, kardiyak arestten kaynaklı global iskemide kan dolaşımının sağlanmasıyla, fokal iskemide pıhtı veya emboli sonucu damar tıkanıklığına bağlı beyin bölgesel kan akımının azalması veya durmasına neden olan sebebi ortadan kaldırmak; yani trombolizdir (5). Damariçi verilen doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ile sağlanan tromboliz ve damarın cerrahi olarak açılması, bu tedavilerin tüm hastalara uygulanamaması yüzünden istenilen başarıyı sağlayamamıştır. Zamanında uygulanan t-PA ile pıhtının trombolizinde önemli aşama kaydedilse de uygulama için sadece iskemi başlangıcından itibaren 3 ila 4,5 saatlik bir zaman kısıtlaması bulunması bu tedavi yönteminin iskemi hastalarının yalnızca % 3,0-8,5'lük kısmına uygulanabilir olduğunu göstermektedir (6).

### 4.1. İskemik beyin felcinin patofizyolojisi

Beyin felci, beyni besleyen damarların tıkanması veya yırtılması sonucu beyin kanlanması bozulması sonucu oluşmaktadır. Kanlanmanın bozulması nadiren damarların yırtılması kaynaklı kanama (yaklaşık % 15) sebebiyle olabildiği gibi, büyük oranda damar tıkanıklığıyla (yaklaşık % 85) oluşmaktadır. İskemik beyin hasarı ise bu süreçte oluşan patofizyolojik olaylar bütünüdür. Bu olaylar bütünü kısaca şöyle özetlenebilmektedir: Enerji eksikliğine bağlı olarak nöronlar depolarize olurlar ve bu depolarizasyon sonrası glutamat reseptörlerinin aktive olmasıyla birlikte nöronların içerisinde biriken  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$  ve  $Cl^{-}$  iyonlarının seviyeleri hızla artar. Bu iyonlar artarken hücre dışına yüksek miktarda  $K^{+}$  iyonu çıkışı olur. Glutamat ile



birlikte  $K^+$  iyonunun fazla miktarda hücre dışına çıkmasıyla birlikte belirli bir bölgede başlayan nöron depolarizasyonu bir dalga gibi yayılır. Hücre içinde  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonlarının birikmesini takiben oluşan ozmotik fark suyu hücre içine çeker ve hücre içine giren su hücrelerin şişmesine neden olur. İkincil mesajcı olan  $Ca^{+2}$  iyonunun hücre içine girmesiyle birlikte hücre yıkımında rol alan proteazlar, lipazlar, endonükleazlar ve kaspazlar gibi bir çok enzim aktive olur. Son olarak da çoğunluğu mitokondri stabilitesinin bozulmasından kaynaklanan serbest radikallerin oluşmasıyla birlikte, hücre membranında ve DNA'da bozukluklar meydana gelir. Serbest radikaller sadece bu yapılara zarar vermekle kalmaz aynı zamanda mikrogial aktivasyonu ve enflamasyonu uyandır (7).

Fokal iskemide, kan akımının azalmasına bağlı olarak etkilenen bölgenin merkezine iskemik çekirdek (*core*) bölgesi denmekte, çekirdek bölgesinin etrafındaki dokuya ise geçiş bölgesi anlamına da gelen penumbra denmektedir. Penumbra bölgesi fiziki olarak tarif edilebilecek bir bölgeden çok, iskemi süresi ve şiddetine bağlı olarak merkez bölgesinin etrafını saran, hacmi iskemiye bağlı olarak değişkenlik gösterebilen bir bölgedir. Bu iki bölgenin oksijenlenme durumları farklı olduğundan bu bölgelerde gerçekleşen hücre ölüm mekanizmaları farklılık göstermektedir (8). Deneysel iskemi oluşturmak için global iskemi ve fokal iskemi olmak üzere iki temel model kullanılmaktadır. Global iskemi tüm beyni besleyen iki veya dört damarın da geçici olarak tıkanmasıyla indüklenirken, fokal iskemi çoğu zaman sadece orta serebral arterin geçici olarak tıkanmasıyla indüklenmektedir. Geçici olarak oluşturulan iskemi modellerinde, damar belirli bir süre boyunca tıkalı tutulup daha sonra reperfüzyona izin verilmektedir. Kalıcı iskemi modellerinde ise tıkanan damarda reperfüzyona izin verilmemekte ve kalıcı tıkanma sonucunda çok daha ağır bir hasar oluşturulmaktadır (8, 9). Beyin hasarı ve hücre ölümü, iskemik çekirdek bölgesinin merkezinden başlayarak penumbraya doğru yayılmaktadır. Serebral kan akımı çekirdek bölgesinde iskemi öncesine göre yaklaşık % 15'e kadar düşerken, merkezdeki adenozin trifosfat (ATP) miktarı % 25'e kadar düşer. Penumbra bölgesinde ise kan akımı % 15 ila % 40 arasında düşmekte, ATP miktarı ise % 50 ila % 70 arasında düşmektedir. Bu sebeple, penumbradaki hasardan etkilenen hücrelerin kurtarılma ihtimali çekirdek bölgesine göre daha fazladır (8, 9).

#### 4.1.1. Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite

Ağırlık olarak vücudun yaklaşık % 2'sini oluştursa da toplam oksijenin % 20'si beyin tarafından tüketilmektedir. Hücrelerin temel enerji ihtiyacı için kullandıkları kimyasal enerjiyi bağlarında taşıyan adenosin trifosfatın (ATP) mitokondride yeterli miktarda üretilmesi ve elektron taşıma zincirinde kullanılması hem enerji ihtiyacını karşılamakta hem de iyon dengesini kurmaya yardımcı olmaktadır. Hücresel seviyede, oksijen eksikliğine bağlı olarak ATP üretilmemesi durumunda hücre içerisindeki ATP sadece 2 dakikalık ihtiyacı karşılamaktadır (10). İskemi sonrası beyin iskemiden etkilenen bölgesine oksijen ve besin gidemeyeceği için nöronlar enerji eksikliği çekmektedir ve hücre içi homeostazislerini dakikalar içerisinde kaybetmektedirler (11). Hücre içinde üretilen enerjinin yaklaşık % 30'unu kullanan  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz pompası, bu enerji eksikliğinden ilk etkilenen mekanizmalardandır. Bu pompanın düzgün çalışmaması sonucunda nöronların membran potansiyeli bozulur ve nöronlar depolarizasyona uğrarlar.  $\text{K}^+$  iyonu hücre dışına çıkarken,  $\text{Na}^+$  iyonu hücre içine girer.  $\text{Ca}^{+2}$  pompasının çalışmaması sonucunda hücre içinde  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu birikir, bunun sonucunda da hücreyi ölüme götürebilecek bir çok mekanizma aktive olur. Uyarıcı bir aminoasit olan glutamat; N-metil-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri üzerinden birçok hücre içi mekanizmayı düzenlemektedir. İskemi nedeniyle hücre dışında yüksek miktarda glutamat birikmesi NMDA ve AMPA reseptörleri üzerinden hücre içine çok miktarda  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun girmesine neden olmakta ve bunun sonucunda nöronal hasar meydana gelmektedir (12-15). Hücrenin iyon dengesini sağlamak için kullandığı her iki yönlü de çalışabilen Na-Ca değiştiricisi (NCX), normal şartlar altında, 1 adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunu hücre dışına atarken hücre içine 3 adet  $\text{Na}^+$  iyonu almaktadır. Ancak, iskemi gibi durumlarda bu değiştirici iskemi sonrası biriken  $\text{Na}^+$  iyonunu atmak için hücre içine  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu alır. Bu yolla giren  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ise hücre içerisinde diğer yollarla giren  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu gibi hasarı kötüleştirir (16).

#### 4.1.2. Oksidatif stres

Hücrelerin içerisinde antioksidan görevi gören endojen enzimler vardır. Normal şartlar altında, bu enzimler, oluşan serbest radikalleri temizlemekte yeterli olmaktadır. Ancak, endojen enzimler iskemi sonrası oluşan fazla miktarda reaktif oksijen türevlerini (ROT) ve reaktif azot türevlerini (RAT) temizlemede yetersiz kalır (17). İskemi sonrasında serbest radikal miktarının arttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve serbest radikallerdeki artışın hasarı arttırdığı düşünülmektedir (18, 19). Ekzitotoksisite ile birlikte oksidatif stres hasarın erken fazında ortaya çıkmaktadır. İskemi sırasında enzimatik olarak oluşan serbest radikaller, reperfüzyon aşamasında oksijenlenmeyle birlikte, oldukça fazla üretilir. Bunun sebebi oksijenin serbest radikallerin önemli bir kaynağı olmasıdır. Kaynakları beyindeki farklı hücreler olsa da özellikle süperoksit anyonları ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri (HO), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) ve nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) iskemik beyinde bulunduğu gösterilmiştir (20). Üç farklı tip nitrik oksit (NO) sentaz (nöronal NOS, nNOS; uyarılabilir NOS, iNOS; ve endotelial NOS, eNOS) tarafından üretilen NO'nun vazodilatasyonu sağlama, kan basıncının düzenlenmesi ve nörotransmitter olarak kullanılma gibi önemli fizyolojik görevleri vardır. Ancak, hücre içerisinde NO'nun artması sonucu lipid peroksidasyonu, enerjinin azalması ve en kötüsü de  $O_2^-$  serbest radikali ile reaksiyona girmesi sonucu daha da tehlikeli bir nörotoksik oksitleyici olan  $ONOO^-$  oluşur (21). Oluşan  $ONOO^-$ , lipid peroksidasyonuna ve apoptoza yol açacak DNA kırıklarının oluşmasına ve mitokondri stabilitesinin bozulmasına, bununla birlikte antioksidan özellikteki enzimlerin tüketilmesine ve kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olur (22).

#### 4.1.3. Enflamasyon

Enflamasyon, bir diğer adıyla yangı, dokunun hasar, patojen, doku kalıntısı gibi tehlike sinyallerine karşı vermiş olduğu yanıttır. İskemi sonrası, hasara paralel olarak artan lokal enflamasyon yanıtları sonucunda homeostazis bozulur ve bununla birlikte enflamasyon iskemik dokuyu ve onun çevresini etkileyen kronik bir hal alabilir. İskemik dokunun merkezinde enflamasyona bağlı hasar oluşumu ve bu hasarın onarım süreci eş zamanlı olarak gerçekleşir.

Tüm serebrovasküler hastalıkların patofizyolojinde olduğu gibi iskemide de hasarın oluşmasında ve önlenmesinde enflamasyonun önemli rolü vardır. İskemiye takiben, ROT'ların oluşması, nekrotik hücre ölümü ve enflamasyon ile ilgili sinyallerin artmasına ve enflamasyonda görev alan immün hücrelerin aktive olmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple, beyinde enflamasyonun önlenmesinin önemli bir klinik tedavi olabileceği düşünülmektedir (23). Aktive olan immün hücrelerin sadece doku yıkımında görev almadığı, aynı zamanda dokunun onarılmasında ve yeniden modellenmesinde de görev alabileceği düşünülmektedir (24). Son yıllarda enflamasyonun beyin hasarı üzerindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmalarda, astroglia, mikroglia, nöronlar ve endotelial hücrelerin birlikte çalışarak enflamasyon ile ilgili yanıtların oluşumunu başlattığı ve KBB'nin bütünlüğünün bozulmasından sonra periferik immün hücrelerin de hücre ölümüne etki ederek bu patofizyolojiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (25, 26).

#### **4.1.4. Yayılan depresyon**

İskemi ya da başka bir sebebe bağlı olarak perfüze olmuş beyindeki nöronların ve bazı astrositlerin büyük çapta depolarize olması durumuna “kortikal yayılan depresyon” denir. Genellikle kortekste dakikada 2-5 mm hızla yayılan bu depolarizasyon dalgasını serebral kanlanmanın artması, dokunun oksijenlenmesi ve metabolizma hızının artması izler. Fizyolojik olmayan, yayılan depresyona bağlı bu değişiklikler geçici bir durumdur (27, 28). Literatürde rapor edilen son çalışmalarda bu durumun beyinin orta serebral arter tıkanıklığı, iki-damar tıkanıklığı (*two-vessel occlusion*) veya oksijen glikoz açlığı gibi durumlara direnebilmesi için geliştirdiği bir koşullanma olduğu öne sürülmüştür (29-31).

#### **4.1.5. Hücre ölüm çeşitleri; apoptoz, nekroz ve otofaji**

Önceleri farelerde ve insanlarda serebral iskemiyi takiben gerçekleşen iki morfolojik hücre ölümü tipi olduğu düşünülmüştür. Bunlar apoptoz ve nekrozdur. Sonrasında yapılan çalışmalarda ise apoptoz ve nekroz tipi hücre ölümüne otofaji de eklenmiştir (32-34).

#### 4.1.5.1. Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilen apoptoz, iske mi gibi birçok nörolojik patofizyolojide önemli rol oynamaktadır. Bu programlı hücre ölümünün iki türlü uyarıyla başladığı düşünülmektedir; biri içsel veya intrinsik, diğeri ise dışsal veya ekstrinsik uyarıdır (35-37). İntrinsik uyarı mitokondrinin stabilitesinin bozulması ve mitokondriyle ilgili sinyaller ile aktive olurken, ekstrinsik uyarı hücre membranında bulunan ölümle ilgili Tümör Nekroz Faktörü (TNF), Fas/CD95, TNF-bağımlı apoptoz indükleyen ligand (*TRAIL*) gibi reseptörlerin uyarılması sonucu aktive olur (38).

İske mi sırasında ekzitotoksisite ile birlikte NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu içeri giren  $Ca^{+2}$  iyonunun hücre içerisinde bir çok mekanizmayı tetiklediği bilinmektedir. Mitokondri membranında bulunan Bcl-2 ailesine ait proteinlerden bazıları (Bcl-2, Bcl-XL, Bclw) membran yapısının korunmasına yardımcı olarak hasarı önlemede görev alırken, bazıları (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid) ise membranın parçalanmasına yardım ederek hasarı arttırır (39). Hücre içerisine giren  $Ca^{+2}$  iyonu anti-apoptotik protein Bcl-2'nin parçalanmasını ve pro-apoptotik protein Bid'in aktive olmasını sağlar (40). Aktive olan Bid, Bad-Box proteinleri ile birlikte mitokondri membranında delikler oluşturur ve bunun sonucunda mitokondriyel sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) mitokondri membranından sitozole çıkar. Sitozole çıkan sitokrom c proteini apoptotik proteaz aktifleyen faktör 1 proteini ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Sitokrom c'nin ortamda bulunması ve apoptozom kompleksinin oluşması sonucunda kaspaz-3 proteaz enzimi aktive olur ve bu enzimin aktivasyonu sonucunda hücrede DNA hasarı ve apoptotik hücre ölümü meydana gelir. Bu enzimin aktive olmasının dışında kaspazlardan bağımsız bir şekilde AIF'nin nükleusa girmesi DNA'da kırıkların meydana gelmesine sebep olur ve sonrasında apoptotik hücre ölümü meydana gelebilir (41). İske mik dokuda kaspaz enzimlerinin aktive olduğu ve bu enzimlerin inhibe edilmesinin iskemik hasarı azalttığı literatürde gösterilmiştir (42).

Ekstrinsik uyarıda ise, TNF ailesinden herhangi bir ligandın hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak reseptörü aktive etmesi gerekir. Bu uyarı sonrasında sitokrom c'nin mitokondriden salınmasından bağımsız olarak kaspazlar aktive olup hasarı başlatabilir (43, 44). Aktive olan reseptörler kaspaz kaskadını

başlatır, sırasıyla kaspaz 8 ve kaspaz 10 enzimleri aktive olur ve son olarak kaspaz 3 enzimini aktive ederler. İntrinsik yolda da olduğu gibi kaspaz 3'ün aktive olması, mitokondri membranının bozulmasına, DNA kırıklarının oluşmasına ve hücre ölümüne neden olur (45).

#### 4.1.5.2. Nekroz

Apoptozdan farklı olarak nekrotik hücre ölümünde sitoplazma vakülli bir hale gelir, hücre membranı parçalanır. Parçalanan hücre membranından hücre içi organellerin ve enflamasyonla ilgili moleküllerin dışarı salınması ile birlikte ölen hücrenin etrafında enflamasyon başlar (46). Morfolojik değişikliklerin yanı sıra, hücre içerisinde enerji yetmezliği, ROT'ların üretimi,  $Ca^{+2}$  homeostazının bozulması ve apoptotik olmayan proteazların aktivasyonu görülür. Apoptozla kıyaslandığında, nekrozun kontrolsüz hücre ölümü olduğu düşünülse de nekrozda da bazı sinyal yollarının aktive olduğu ve hücre içi moleküller ve biyokimyasal olaylar arasındaki ilişkiyle kontrol edildiği literatürde yapılan bir çalışmada önerilmiştir (47). Kaspaz inhibitörlerinin bulunduğu durumlarda bile, ölümle ilgili bazı reseptörlerin (örn., TNFR1, Fas/CD95, TRAIL-R, TRL3 ve TRL4) nekrozda aktive olduğu düşünülmektedir. Nekrotik hücre ölümünde asıl görev alan kinazların reseptörle etkileşen protein kinazlar (*receptor interacting protein, RIP, kinases*) olduğu düşünülmektedir (48).

#### 4.1.5.3. Otofaji

Otofaji kısaca hücre membranının organelleri ve sitoplazmadaki makro molekülleri içine alacak şekilde içeri doğru katlanarak, otofagozom oluşturması ve içindeki materyallerin parçalanması için lizozoma taşınması olarak açıklanabilir (49). Nöronal otofajinin ise iki önemli özelliği bulunmaktadır. Birincisi, 48 saate kadar süren açlıkta bile fare beyininde nöronal otofaji görülmemiştir (50). İkincisi, otofagozom ve lizozomun konumuyla ilgilidir: Her ne kadar otofagozom sitoplazma içerisinde yer alsın da lizozomlar hücre gövdesinin jukstanükleer sitoplazmasında yer almaktadır (51).

Nöronlarda otolizin oluşması için, dendritik veya sinaptik sonlarda oluşan otofagozomların önce hücre gövdesinde yerleşmiş bulunan lizozoma taşınması gerekir. Ancak, hasar dendritik veya aksonal uçtaysa ve hasar yüzünden oluşan otofagozomlar hücre gövdesine taşınamıyorsa, otofagozom içerisinde bulunan materyal lizozoma ulaşamayacağı için otofaji görülmez (51).

## **4.2. Beyin felcinde muhtemel klinik tedaviler ve tedavide karşılaşılan zorluklar**

### **4.2.1. Doku plazminojen aktivatörü (t-PA)**

Akut serebral iske mi için, rekombinant doku plazminojen aktivatörü Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilmiş ve 1996'dan beri kullanılmakta olan tek tedavi yöntemidir. İske mi geçiren hastalara bu tedavinin yapılabilmesi için iske mi başlangıcının bilinmesi gerekmektedir ve daha da önemlisi iske mi başlangıcından 3-4,5 saat sonra ilacın etkinliği bulunmamaktadır. Bu süre aşıldığında, ilacın kan beyin bariyerine etki ettiği ve faydasından daha çok yan etkilerinin olduğu gösterilmiştir (52). Özellikle teşhis ile ilgili sıkıntılar olduğunda bu ilacın süre sınırlaması nedeniyle kullanılması halinde toksik etki oluşturabileceğinden iske mi geçiren hastalarda kullanım oranı çok azdır. Bu sıkıntıların üstesinden gelebilmek için oluşan pıhtıyı çözebilecek pıhtı çözücü maddeler ile cerrahi olarak pıhtıyı almayı sağlayabilecek cihazların geliştirilmesi ve bunların deneysel olarak test edilmesi devam etmektedir (52, 53).

### **4.2.2. Oksijen tedavisi**

Serebral iske minin klinikte uygulanan tek tedavisinin *t-PA* olması ve bu tedavinin de kullanımıyla ilgili en büyük kısıtlayıcı faktörün zaman olması araştırmacıları yeni tedaviler bulmaya yöneltmiştir. İlk başta hayvanlarda denen en ve nöroprotektif olduğu düşünülen ilaçların klinikte denenmesi üzerine alınan kötü sonuçlar farklı yolların düşünülmesini sağlamıştır. Yeni tedavilerin sahip olduğu önemli stratejilerden biri de oksijen azlığı çeken beyin hücrelerine bir an önce oksijeni götürebilmektir. Bunun için deniz seviyesinde 1 atm basınçta % 100 (normobarik) oksijen tedavisi veya deniz seviyesinde 1 atmosfer basınçtan daha yüksek basınçta (hiperbarik) oksijen tedavisi ve bu tedavilerin farklı kimyasallarda kombinasyonunu

içeren birçok çalışma bulunmaktadır (54, 55). Klinikte kullanılabilirliğinin yanı sıra, ambülanslarda da uygulanabilir olması ve daha az teknik ekipmana ihtiyaç duyulması sebebiyle normobarik oksijen tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisine göre daha kolay ulaşılabilir ve tercih edilebilir bir tedavi potansiyeli taşımaktadır (56).

#### **4.2.2.1. Normobarik oksijen tedavisi**

İskemi başlangıcından sonra uygulanan normobarik oksijen tedavisinin iskemili dokunun oksijenlenmesini artırıp, apoptotik hücre ölümünü azalttığı hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (57, 58). Henniger ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, iskemi başlangıcından 30 dakika sonra 3 saat boyunca uygulanan normobarik oksijen tedavisi sonrası enfarktüs hacminin yaklaşık % 10, tedavi süresinin 3 saatten 6 saate çıkarılmasıyla ise enfarktüs hacminin yaklaşık % 44 azaldığı gösterilmiştir (56). İskemi sonrası normobarik oksijen tedavisinin dokunun oksijence zenginleşmesine yol açtığı, oksijenlenen dokunun enfarktüs hacminin düştüğü, nörolojik fonksiyonlarla ilgili iyileşmenin olduğu, ROT'ların azaldığı ve kaspaz-8 inhibisyonunun gerçekleştiği bilinmektedir (59, 60).

#### **4.2.2.2. Hiperbarik oksijen tedavisi**

Normobarik oksijen tedavisine benzer şekilde hiperbarik oksijen tedavisi de invazif olmayan bir tedavi olup, iskemi tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (61). Beyin hücrelerinin oksijenli solunum yaptığı, oksijen yokluğuna uzun süre dayanamadığı ve yüksek enerjiye ihtiyaç duydukları bilinmektedir (62). Hiperbarik oksijen tedavisi ile birçok fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik mekanizmanın bir arada serebral kanlanmanın artmasında rol oynadığı deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (63, 64). İskemi sonrası uygulanan hiperbarik oksijen tedavisiyle birlikte, glutamat, pirüvat ve laktat gibi hücre dışı eksitotoksik metabolitlerin azaldığı, böylece ekstrasellüler ortamda homeostazisin sağlandığı bilinmektedir (63, 65). Bilinen tüm iyi yönlü etkilerine rağmen hem normobarik hem de hiperbarik oksijen tedavisinin birtakım yan etkileri de bulunmaktadır. Uygulanan oksijenin damarlarda kasılmaya yol açarak dokudaki oksijenlenmeyi azalttığı, bunun yanı sıra NO ile etkileşime girerek zararlı süperoksit radikallarının oluşumunu hızlandırdığı düşünülmektedir (54, 66). Dahası, hiperbarik oksijen tedavisinin 3 atmosfer basınçta



uygulandığında serebral kan akımını % 26-39, 4 atmosfer basınçta uyulandığında ise % 37-43 oranlarında düşürdüğü de gösterilmiştir (54, 67). Özet olarak, hem normobarik oksijen tedavisi hem de hiperbarik oksijen tedavisi iskemi sonrası önemli tedavici özelliklerinin yanında hasarı arttırabilecek bazı yan etkiler de taşımaktadır (68-70).

#### **4.2.3. Hipotermi**

Vücut sıcaklığının düşürülmesinin her ne kadar elektrolit dengesi, glikoz intoleransı ve immün sistemin baskılanması gibi birçok yan etkisi olduğu bilinse de, literatürde hayvanlarda iskemiye bağımlı oksidatif stresi azalttığı gösteren çalışmalar da vardır (71-73). Deneysel hayvan modelleri ile literatürde yapılan bir çalışmada hipotermi ROT'ları anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (74). Bu çalışmanın kliniğe uyarlanması sonucunda ise vücut sıcaklıkları 33°C'ye düşürülen hastaların ROT değerlerinin hipotermi öncesine göre anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür (75). Deneysel hayvanlarla yapılan çalışmaların sonuçlarına göre hipotermi tedavisinin sadece iskemi sonrası değil, aynı zamanda iskemi cerrahisi sırasında kullanılmaya başlanmasıyla birlikte iskemik hasarı azaltacağı düşünülmektedir (76). Bunu test etmek için yapılan bir çalışmada deneysel iskemi sonrası hipotermi mikrovasküler bazal lamina antijeni kaybını engellediği gösterilmiştir. Hipotermi tedavisiyle; (77) iskemi sonrası t-PA kaynaklı hemorajinin azaldığını, (78) iskemi sonrası t-PA verilen hayvanlarda enfarktüs hacminin azaldığını ve kan beyin bariyeri stabilitesinin arttığını, (79) oksidatif DNA hasarının azaldığını ve ölümle ilgili sinyallerin azaldığını göstermişlerdir. Aynı zamanda hipotermi astroglisis aktivasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (80). Sistemik soğutmanın birtakım yan etkileri olabileceğinden bu çalışmalara ek olarak yalnızca beyin bölgesel olarak soğutulmasının da iskemi sonrası hasar gelişimini azaltacağı düşünülmektedir (81).

#### **4.2.4. Serebral kollateral kanlanma**

İskemide arteriyel tıkanma sonucunda kollateral kanlanmanın sağlanmasının önemli bir sonuç olabileceği düşünülmektedir. İskemi tedavisi çalışmalarının deneysel modellemelerden öteye geçip, kliniğe uyarlanabilir bir hal almasında kollateral

kanlanmayı sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesinin önemli rolü olduğu hipotezi literatürde yer almaktadır (82). Bunu başarabilmek için kollateral kanlanma ile ilgili mekanizmaların iyi anlaşılması gerekmektedir. Asıl iskemik dokunun ve iskeminin çevresindeki geçiş hattının kanlanması ve bu kanlanmanın görüntülenmesi ile ilgili birçok çalışma vardır (83-85). Kollateral kanlanma gibi koruyucu mekanizmalardaki bozulmalar iskemi kaynaklı olduğu gibi yüksek tansiyon ve şeker hastalığı sonucu da görülebilir. Özellikle geçiş bölgesindeki kanlanmanın azalmasıyla birlikte iskemik hasar genişleyecek ve iskemiden etkilenen doku hacmi artacaktır (86). Kollateral kanlanmanın iyi bir şekilde sağlanması sonucunda klinikte iskemiye bağlı hasarın azalacağı gösterilmiştir (87).

#### **4.2.5. Zamanlama**

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda araştırmacılar ilaçların uygulanacağı zamana ve iskemi-reperfüzyon süresine kendileri karar verir, klinikte ise iskeminin tam olarak başlangıç zamanı ve süresi bazı hastalarda bilinemez. Bu sebeplerle deneysel olarak başarılı olmuş tedavi yöntemleri klinik uygulamalarda zaman yüzünden başarısızlıkla sonuçlanır. Gelişen teknoloji ile birlikte her ne kadar görüntüleme teknikleri gelişse de, hastaların hastaneye varış süreleri ve iskemi başlangıcından teşhis konulan süre arasındaki farkın bilinmemesi deneysel tedavi modellerinin kliniğe uyarlanabilirliğini azaltmıştır. İskemi tedavisinde iskemiye neden olan tıkanıklığın açılması ya da kanamanın ortadan kaldırılmasının yanı sıra, iskemi sonrası ortaya çıkan enflamasyonla alakalı ve apoptotik süreçlerin tedavisinde de başarılı sonuç elde edebilmek için iskemi başlangıç zamanının tam olarak bilinmesi önemlidir (88).

#### **4.2.6. Yaş ve diğer hastalıklar**

Deneysel çalışmalar doğası gereği genç ve sağlıklı hayvanlar ile kurgulanırken, çoğu zaman iskemi hastası kişiler 45 yaş üzeri olup diyabet, yüksek tansiyon ve kalp hastalıkları gibi birçok başka hastalığa da sahiptirler. Yaşlı ve çok sayıda hastalığa sahip bir insandaki birçok mekanizmayı aynı anda taklit edebilecek yeni bir deney hayvanı modeli oluşturulması bu sorunun çözümü için gereklidir (7).

#### **4.2.7. İnsan ve deney hayvanları arasındaki morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar**

İnsanlardaki patofizyolojik mekanizmaları anlamak için deney hayvanları kullanılsa da arada önemli fizyolojik farklılıklar vardır. Örneğin; en çok kullanılan deney hayvanlarından biri olan ratlarda glikoz ve oksijen metabolizması ile kan akımı insana göre üç kat daha fazladır. İnsan ve laboratuvar hayvanları arasında sadece fizyolojik parametrelerde değil aynı zamanda beyindeki hücre yoğunluğunda da farklılıklar bulunmaktadır. İnsan beyinde kıvrımlar bulunurken, ne ratlarda ne de farelerde bu kıvrımlar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, beyin kanlanması da anatomik olarak farklar bulunmaktadır. Bütün bunların sonucunda kullanılan deneysel hayvanda oluşturulan hasar modeli ile klinikte karşılaşılan hasar arasında fark ortaya çıkmaktadır. Zamana bağlı olarak da değişim gösterebilecek hasarın deneysel bir tedavisinin bulunmasının kliniğe uyarlanabilirliğindeki zorluk buradan başlamaktadır (89).

#### **4.2.8. İlaçların yan etkileri**

Deney hayvanlarında ekzitotoksiteyi engelleyen birçok kimyasalın psikoz ve kardiyovasküler yan etkileri bulunmaktadır. Hayvanlarda etkili olan kimyasalın insanlarda tolere edilebilen limitte kalması ve yine etkili olabilmesi için çok yüksek bir etkin doza sahip olması gerekmektedir. Bu da çok daha güvenli ve yan etkisi olmayan ilaçların dizayn edilmesi gerekliliğini zorunlu kılmaktadır (90).

#### **4.3. Fonksiyonel geri kazanım**

Her ne kadar hasar, iskeminin süresine ve etkilediği beyin bölgelerine bağlı olsa da iskemi hastalarında çoğu zaman tam bir iyileşme görülmez. Buna rağmen çoğu hastada kısmi bir nörolojik iyileşmenin görüldüğü de literatürde belirtilmiştir (91, 92). Fonksiyonel iyileşmeye örnek olarak i) hastanın en azından günlük yaşamdaki işlerini kendi başına yapabilecek seviyede olması, ii) hasara kontralateral kol veya bacak kaslarını kullanabilmesi, iii) hasara ipsilateral kol veya bacak kaslarının kontrolünü sağlaması verilebilir. Fonksiyonel iyileşmede görev alan fizyolojik mekanizmalar tam olarak bilinmese de hasarın neden olduğu sürecin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Nörolojik fonksiyon kaybının sebebi, bu fonksiyonel göreve ait olan

beyin bölgesinin hasar görmesi olabileceği gibi, fonksiyonel göreve ait olan beyin bölgesindeki hücre aksonlarının hasar gören bölgeden geçmesi de olabilir. Ancak çoğu zaman hasar direkt olarak bir görevden sorumlu olan bölgede olduğu için o işle ilgili nörolojik fonksiyonlarda kayıp olur. Bu kaybı ortadan kaldırmak, öncelikle hasarlı bölgedeki ölen nöronlardan kaynaklanan fonksiyon kaybının önüne geçilmesini gerektirmektedir. Bunun için de hasarlı bölgede hayatta kalan nöron sayısını ya da yeni oluşan nöron sayısını arttırabilmek önemlidir. Bununla birlikte hasarsız bölge ile hasarlı bölge arasında yeni nöronal bağlantıların kurulmasının, böylelikle de fonksiyon kaybının işlevini dolduracak yeni sinapslar oluşmasının önemli olduğu düşünülmektedir (93).

Plastisiteyi kısaca dışarıdan gelen uyarılara karşı beyin kendi iç nöronal bağlantılarını değiştirmesi olarak tanımlayabiliriz (94). Benzer şekilde hasar sonrası yetişkin beyin, hasardan etkilenmeyen bölgedeki nöronların bağlantılarını düzenleme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda bu yapısal organizasyonun hasardan uzakta kalan beyin kökünde ve hasara kontralateral hemisferde olduğu gösterilmiştir (95-98). Genel olarak yapılan bu tür çalışmalarda spontan bir iyileşmeden çok farmakolojik bir kimyasalın etkisi denense de sonuç olarak görev alan mekanizmaların ve süreçlerin benzer olabileceği düşünülmektedir. İskemi hastalarında yapılan beyin görüntüleme çalışmalarında hasarlı elin hareketi sırasında hasara kontralateral serebral hemisferin de aktif olduğu görülmüştür (99, 100). Deney hayvanlarıyla yapılan iskemi modellemelerinde yalnızca hasara kontralateral hemisferde değil, aynı zamanda ipsilateral hemisferin hasara komşu olan nöronlarında da yapısal değişiklikler olduğu gösterilmiştir (101-103). Tıkanan damarın beslediği, direkt olarak iskemik hasardan, dolaylı olarak ekzitotoksik ve enflamasyon durumundan etkilenen nöronların da yeni akson uzatma ve yeni bağlantılar yapma kapasitesine sahip olduğu düşünülmektedir (102, 104, 105). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda iskemik hasardan sadece nöronların değil aynı zamanda oligodentrosit gibi yardımcı hücrelerin de etkilendiği gösterilmiştir (106-108). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hasar sonrası etkilenen striatumda miyelin kılıf yapma görevi olan oligodentrosit sayısı ile yeniden miyelinlenmenin arttığı gösterilmiştir (109). Yine aynı çalışmada, sadece hücre miktarında artış olmadığı, bunun yanı sıra artan hücre sayısının ve miyelinlenmenin de motor fonksiyonu

arttırdığı gösterilmiştir. Ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise korpus kollozumdaki hücre yoğunluğunun, atrofi varlığı ya da yokluğunun ve oligodentrosit sayısının fonksiyonel iyileşme ile paralellik gösterdiği belirtilmiştir (110).

#### **4.4. Plastisite**

Hem olgunlaşmamış hem de yetişkin beyinde hasar sonrası çevresel zenginleştirme denilen, (*environmental enrichment*, EE), pozitif bir çevrede bulunmanın hasarın zararlı sonuçlarını azalttığı bilinmektedir. Çevresel zenginleştirmenin beyinde iskemi gibi birçok benzer hastalığa bağlı hasarı nörogenezi, dendritik morfolojinin arttırılmasını ve yeni akson uzamasını sağlayarak azalttığı gösterilmiştir (111-115). Çevresel zenginleştirme ile ilgili birçok moleküler ve hücrenel faktör bulunmuş olsa da iskemik beyin hasarı sonrası fonksiyonel iyileşme ve sinaptik plastisitenin artan nörotrofik faktör üretimine bağlı olduğu düşünülmektedir (115-117). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda iyileştirme etkisi en yüksek nörotrofik faktör olan beyin türevli nörotrofik faktörün (BDNF), merkezi sinir sisteminde sinaptik plastisiteyi arttırdığı, nörogenez ve hücrelerin hayatta kalımına pozitif yönde etki ettiği gösterilmiştir (118). Bu iyileşme sürecinde sadece nörotrofik faktörlerin değil aynı zamanda yeni sinaps oluşumunu destekleyen bir protein olan sinaptik vezikül-bağımlı protein (sinaptofizin) gibi proteinlerin de önemi vurgulanmıştır (119).

Literatürde yapılan çalışmalarda beyin-türevli nörotrofik faktör ve sinaptofizin gibi proteinlerin sadece morfolojik değişikliklere sebep olmadığı aynı zamanda iskemi sonrası kognitif parametrelerde de iyileşme sağladığı gösterilmiştir (120-123). Buna rağmen literatürde çevresel zenginleştirme ve plastisitede rol alan mekanizmalarla ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

##### **4.4.1. Efrin reseptörleri, efrin A5 ve efrin B1**

Tirozin kinaz ailesinin üyesi olan efrinlerin ve efrin reseptörlerinin merkezi sinir sisteminin gelişimsel sürecinde büyüme ile ilgili baskılayıcı rolü olduğu düşünülmektedir. Erişkin beyinde ise özellikle hasar sonrası efrinlerin hücre hareketinin kontrolünde, akson uzamasında ve hücre göçünde kılavuz görevi görerek

plastisitede rol aldığı belirtilmiştir (124). Efrin A5'in aksonal uzamayı düzenlediği ve Efrin A5'in gen seviyesinde ortadan kaldırılmasının kortikal somatik alanda yanlış projeksiyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (124, 125). Bir diğer tirozin kinaz reseptörü olan Efrin B'nin ise nöronların birbirleriyle yaptığı bağlantılarda ve yeni sinaps oluşumunda önemli görevleri olduğu bilinmektedir (126). Özellikle hücreler arası etkileşimde rol alarak sadece gelişim sürecinde değil, aynı zamanda hasar sonrasında da akson uzamasına kılavuzluk ettiği, böylelikle nörogenezde rol aldığı düşünülmektedir (127, 128).

#### **4.4.2. Netrin-1**

Merkezi sinir sisteminin gelişimsel evresinde Netrin-1'in hücrel göçü pozitif yönde veya negatif yönde etkileyebildiği bilinmektedir. Bunun sebebinin hedef hücredeki reseptörün varlığına bağlı olduğu ve sadece hücrel göçte değil aynı zamanda hücrel hayatta kalımda da rol aldığı düşünülmektedir (129). Özellikle ventrikül altı bölgede yüksek miktarda eksprese edilen Netrin-1'in hücrel göçü ve bölgesel damarlaşmayı arttırdığı gösterilmiştir (130).

#### **4.4.3. Büyüme ile İlgili Protein 43 (GAP43)**

Beyinde iskemi sonrası ortaya çıkan büyüme ile ilgili proteinlerin, akson uzaması ve sinaps oluşumunda önemli rolleri olduğu ve bunun sonucunda plastisiteyi etkilediği düşünülmektedir. Bu proteinler arasından büyüme ile ilgili protein 43 (GAP43)'ün plastisitedeki rolünü anlamak için 1990'ların başından bu yana birçok araştırma yapılmıştır (131-134). Nöronal gelişimsel evrede bu proteinin akson uzaması esnasında ve sinaps oluşumunda yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (131, 133, 134). GAP43 ekspresyonunun sadece gelişimsel evrede değil aynı zamanda yetişkin beyin ve omurilik hücrelerinde de olduğu bilinmektedir (135, 136).

Nöronal büyüme faktörü gibi trofik faktörlerin bu proteinin ekspresyonunu etkilediği ve biyokimyasal aktivitesinde rol aldığı gösterilmiştir (137, 138). GAP43 delesyonu olan farelerde yapılan çalışmalarda aksonal yön bulmanın ve uzamanın başarısız olduğu, aynı proteini fazla miktarda eksprese eden farelerde ise yeni akson

oluşumunun arttığı bilinmektedir (139, 140). Bütün bunlara bakıldığında iskemik fare beyinde GAP43'ün plastisite üzerinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir (141).

#### **4.5. Nörotrofik faktörler**

Nörotrofik faktörler; hücre sel hayatta kalımda, büyümede ve hücre sel farklılaşmada rol alan mekanizmaları düzenleyen polipeptitlerdir. Kortikal yayılan depresyonla birlikte iskemi sonrası glial hücrelerin aktive olması ve nörotrofik faktör üretiminin artması sayesinde sadece akut dönemde değil kronik dönemde de iyileşme sağlandığı gösterilmiştir (142).

##### **4.5.1. Beyin-Türevli Nörotrofik Faktör (BKNF, *BDNF*),**

Etkisi en çok çalışılan büyüme faktörü olan BTNF'nin kortikal yayılan depresyon sonrası miktarının arttığı ve bu artışa bağlı olarak hasarda azalma olduğu gösterilmiştir (142, 143). Literatürde yapılan bir çalışmada BTNF'de gözlenen bu artışın hasardan 1 gün sonra başladığı ve 7 güne kadar devam ettiği gösterilmiştir (144).

##### **2.5.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEBF, *VEGF*)**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü'nün (VEBF), endotel hücreye özgü olarak hücre bölünmesini tetikleyen bir role sahip olmasının yanı sıra dimerik bir protein olarak birçok yolla damarlaşmayı arttırdığı bilinmektedir (145-147). Damarlaşmayı arttırarak, gelişimsel süreçte, rejenerasyon sürecinde, dokunun restorasyonunda ve tümör formasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (145-147). Farelerde yapılan birçok hipoksi ve iskemi çalışmasında nöronal iyileşme için dokuda yeni damarlar oluşması gerektiği ve nöronların oluşan bu damarlar aracılığı ile beslendiği gösterilmiştir (148, 149). VEBF ve bu faktörün reseptörü ile ilgili sinyal mekanizmalarının aktivasyonunun sadece damarlaşmayı arttırmadığı, aynı zamanda fonksiyonel geri kazanımı da arttırarak beyin hasarı sonrası nöronal iyileşmeyi pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir (150, 151).

#### **4.5.3. Siliyer Nörotrofik Faktör (SNF, CNTF)**

Farelerde yapılan gen silme veya antikor ile bloklama çalışmaları sonucunda siliyer nörotrofik faktörün (SNF) endojen nörogenezi düzenlediği gösterilmiştir (152). İskemi sonrası hasarlı kortekste miktarının 20 kat arttığı ve ventrikül altı bölgede endojen nörogenezi etkilediği ile ilgili çalışmalar olsa da iskemi sonrası nörogenezi etkileme mekanizması tam olarak bilinmemektedir (152, 153).

#### **4.5.4. Mezensefalik Astrosit-türevli Nörotrofik Faktör (MANF)**

Ventral mezensefalik hücre hattından (VMCL1) hazırlanan şartlandırılmış hücre kültürü ortamı ile yapılan çalışmanın sonucunda hücre kültürü sıvı ortamında rat dopaminerjik nöronlarının hayatta kalımına etki eden bir faktörün bulunduğu düşünülmüştür (154). Daha sonra yapılan bir çalışmada bu faktörün 20 kDa büyüklüğünde bir protein olduğu gösterilmiş ve bu protein mezensefalik astrosit-türevli nörotrofik faktör (MANF) olarak adlandırılmıştır (155). Bu nörotrofik faktörün serotonerjik veya GABAerjik nöronlara bir etkisinin olmadığı ancak dopaminerjik nöronlar için koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Ancak MANF'ın memeli merkezi sinir sistemi gelişimindeki rolü ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Buna rağmen MANF'ı genetik olarak eksprese edemeyen fare hatlarında yapılan çalışmalarda bu nörotrofik faktörün endoplazmik retikulumda (ER) düzgün katlanamamış protein birikimi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (156). MANF eksikliğinde farelerde yetersiz insülin üretimi ve diyabet benzeri hastalıklar görülmüştür. İnsülin eksikliğine bağlı olarak karaciğerde bulunan beta hücrelerinin proliferasyonunda düşme ve hücre ölümünde artış gözlemlenmiştir. Hücrede görülen katlanmamış protein cevabında (KPC) da benzer şekilde beta hücrelerindeki kayıplar sonucunda MANF ile KPC arasındaki ilişki araştırılmaya başlanmıştır (156). KPC oluşturmak için ER stresi indükleyen toksik kimyasallar uygulandığında hücre kültüründe MANF ekspresyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (157). Hücre kültüründe kardiyak miyositler üzerinde yapılan bir çalışmada ise iskemi reperfüzyon hasarıyla birlikte endojen MANF miktarının arttığı, RNA interferans yöntemi kullanılarak MANF artışının gen düzeyinde engellenmesi ile kardiyomiyositlerde ölümün arttığı gösterilmiştir (158). Farelerde yapılan çalışmada rekombinant MANF



proteinin verilmesinin fotoreseptör transplantasyonun entegrasyonunu arttırdığı ve retinal dejenerasyonu azalttığı bilinmektedir (155).

Sonuç olarak merkezi sinir sisteminde MANF'nin ekspresyonunun olduğuna dair birçok çalışma bulunsa da iskemi sonrası rolü ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada MANF'nin *tunikamisin* ve *thapsigargin* gibi endoplazmik stres indükleyen kimyasallar verildikten sonra primer hücrelerde hayatta kalım üzerine etkisi araştırılmıştır (159). Bir başka çalışmada hangi dokuda ekspresyonu olduğu tam olarak bilinmeyen MANF'nin doku özelinde gen ve protein seviyesinde ekspresyon analizi yapılmıştır (160). Fare kalbinde *in vivo* olarak yapılan çalışmayla MANF'nin miktarının endoplazmik strese cevap olarak arttığı gösterilmiştir (158). Ratlar üzerinde yapılan çalışmada akut dönemde MANF tedavisinin enfarktüs hacimini ve apoptotik hücre aktivitesini azalttığı, kronik dönemde ise 14 günlük süreçte davranış deneyleriyle fonksiyonel geri kazanımı iyileştirdiği gösterilmiştir (161). Ancak bu çalışmada daha uzun dönemdeki etki, fonksiyonel geri kazanımı etkileyen gen ve protein seviyesindeki değişiklikler ve aksonal projeksiyonlar çalışılmamıştır. Ratlar üzerinden yapılan bir başka çalışmada MANF'nin serebral iskemi sonrası koruyucu etkisi ve doku spesifik ekspresyon profili çalışılmıştır. Alınan sonuçlarda MANF'nin endoplazmik stres kaynaklı ortaya çıkan hücre ölümünü azalttığı belirtilmiştir. Primer kortikal hücre kültüründe yapılan apoptotik hücrenin değerlendirildiği kısımda ise, *in vitro* ortamda MANF'nin hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (162). Ratlarda yapılan çalışmada adenovirüs yardımıyla MANF'nin yüksek miktarda ekspres edilmesinin iskemideki rolü araştırılmıştır. Bu çalışmayla MANF tedavisinin enfarktüs hacimini azalttığı ve kronik dönemde ise 14 günlük süreçte davranış deneyleriyle fonksiyonel geri kazanımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada daha uzun dönemdeki etki, fonksiyonel geri kazanımı etkileyen gen ve protein seviyesindeki değişimler ve aksonal projeksiyonlar çalışılmamıştır (163). MANF'nin astrositlerdeki ekspresyon profili hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda çalışılmıştır. Yapılan çift immünofloresan boyamalarıyla iskemi sonrası MANF'nin astrositlerde yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (164). Ratlarda yapılan çalışmada ise MANF'nin iskemi sonrası nöroprotektif rolü olduğu gösterilmiştir. İskemi sonrası MANF tedavisinin enfarktüs hacmini düşürdüğü ve fonksiyonel geri kazanımı sağlarken, kaspaz-3'ü inhibe ettiği ancak endoplazmik retikulum kaynaklı

stresle ilgili protein ekspresyonlarına bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (165). MANF'nin sekans motiflerinin hücreyi hayatta kalım ile ilgili proteinlerin ekspresyonuna etkisi çalışılmıştır (166). Beyinci enjeksiyonla verilen MANF proteininin iskemi sonrası hayatta kalma ve nöronal hasara olan etkileri araştırılmıştır. Ratlarda yapılan bu çalışmada, MANF'nin katlanmamış protein cevabını etkileyerek, 14 günlük sürede mortaliteyi azalttığı, 7 gün sonunda enfarktüs hacimini azalttığı, nöronal hayatta kalımı sağladığı ve kaspaz-3'ü inhibe ettiği gösterilmiştir (167). Farelerde yapılan çalışmada MANF'nin kalp iskemisindeki rolü araştırılmıştır (168). Primer astrositlerde yapılan çalışmada MANF'nin oksijen glikoz açlığı kaynaklı hücre ölümünü ve endoplazmik retikulum stres kaynaklı enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (169). Literatürdeki tüm bu çalışmalara rağmen, MANF'nin farede iskemi sonrası rolü, herhangi bir reseptör üzerinden çalışıp çalışmadığı ve hedef mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

#### **4.5.5. Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (SDNF, CDNF)**

Serebral dopamin nörotrofik faktörün (SDNF), biyoinformatik çalışmalarla ve DNA sekanslama yöntemleri sonucu omurgalılara spesifik olarak MANF'a paralog olduğu tanımlanmıştır (170). Yeni bulunmuş olması sebebiyle hem CDNF hem de MANF genini taşıyan organizmalarda CDNF'nin fonksiyonu ile ilgili yeterince çalışma yoktur. Ancak, hücre kültüründe yapılan çalışmalarda MANF'a benzer şekilde, rekombinant CDNF'nin katlanmamış protein cevabını azalttığı gösterilmiştir (171). Bu sebeple Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, omurilik hasarı ve periferik sinir hasarı gibi modellerde rekombinant CDNF'nin rolü araştırılmıştır (170, 172). 6-hidroksidopamin ile indüklenen rat Parkinson modelinde rekombinant CDNF'nin koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada toksin enjeksiyonundan 4 hafta sonra tek doz olarak uygulandığında bile rekombinant CDNF'nin hücre ölümünü anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (170). Transgenik fareler üzerinde oluşturulan Alzheimer modelinde ise hipokampüse enjekte edilen rekombinant CDNF'nin uzaysal hafızayı iyileştirse de öğrenme, kısa süreli hafıza ve amiloid plak patolojisini etkilemediği görülmüştür (172). Siyatik sinir kesisi ve omurilik hasarı gibi travmatik hasar modellerinde, kök hücre tedavisi CDNF ile kombine edilmiş; CDNF transplante edilen kök hücreler hayatta kalmış, aksonal uzamayı ve fonksiyonel geri kazanımı

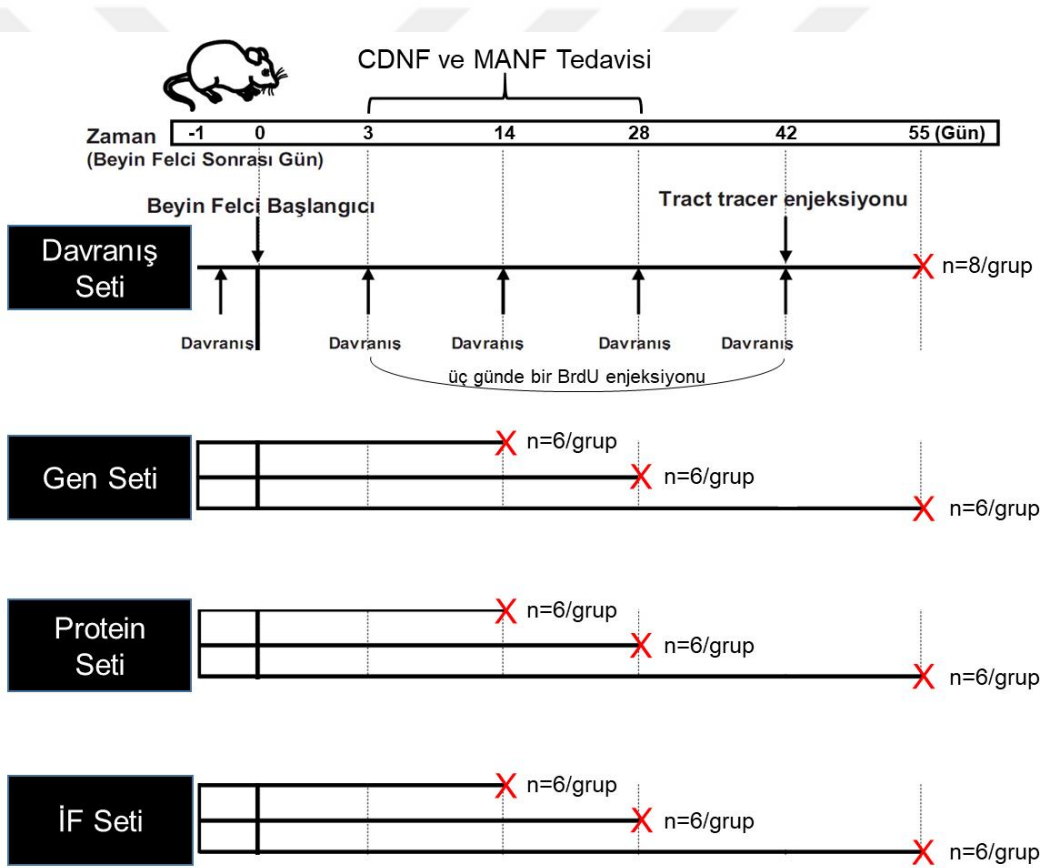
arttırmıştır (173, 174). Ancak, bunun CDNF tedavisinin direkt bir etkisi mi yoksa kök hücreler üzerinden sağladığı bir etki mi olduğuna dair kesin sonuç bulunmamaktadır.

CDNF'nin serebral iskemik hasardaki rolü ile ilgili çok çok az yayın bulunmaktadır. Literatürde bulunan bir çalışmada CDNF'nin ve astrositlerin endoplazmik retikulum stresine karşı verdiği cevap tunicamisin ile astrositlerde enflamatuvar bir hasar yaratılıp CDNF'nin bunun üzerinde etkisi araştırılmıştır (175). Astrositlerin kan beyin bariyeri üzerindeki rolüne atf yaparak iskemik hasar gibi kan beyin bariyerinin bozulduğu ve enflamasyonun arttığı bir süreçte de etkin bir rolü olduğu önerilse de bu konuda herhangi bir çalışma yapılmamıştır (175). Bir başka çalışmada primer hücre kültüründe mikrogliaları lipopolisakkaritlerle inkübe ederek CDNF'nin miktarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca lipopolisakkaritlerle uyarılan mikroglia enflamasyonunda CDNF'nin rolü araştırılmıştır. Bu çalışmada merkezi sinir sisteminde mikroglia hücrelerinin sebep olduğu enflamasyonun önlenmesinin nöronal hayatta kalımı arttıracığı önerilse de bu etkiyi *in vivo* olarak test etmemişlerdir (169). Ratlarda yapılan çalışmada adenovirüs yardımıyla CDNF'nin yüksek miktarda eksprese edilmesinin bölgesel olarak hedeflenmesi ve bunun kortikal iskemi sonrası hasara etkisi araştırılmıştır (176).

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Deney dizaynı ve deneysel gruplar

Hayvanlara yapılan bütün müdahaleler ve deneyler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (16/2014) alınarak yapılmıştır. Deneyler öncesinde ve sonrasında fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde kendilerine ayrılmış odalarda tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan 8-12 haftalık erkek C57BL6j suşu fareler rastgele olarak 1 µg/gün CDNF veya 1 µg/gün MANF veya taşıyıcı kontrol (PBS) grubuna ayrılmıştır. Davranış seti için grup başı 8, diğer setler için grup başı 6 hayvan kullanılmıştır.



**Şekil 5.1.1.** Deney dizaynı. Davranış seti için grup başı 8 hayvan kullanılmış olup, diğer setlerde grup başı 6 hayvan kullanılmıştır. Otuz dakika iskemi sonrası 72 saat beklenmiş, 72. saatin sonunda 1 µg/gün dozunda olacak şekilde CDNF, MANF veya taşıyıcı kontrol (PBS) tedavileri 28 gün boyunca ozmotik pompa yardımıyla verilmiştir.

## 5.2. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO) ve ozmotik pompa yerleştirme

C57BL6j suşu fareler orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyon süresi boyunca % 1'lik izofluran gaz anestezisi altında ve vücut sıcaklıkları 36,5-37,0 °C arasında tutulmuştur. Benzer şekilde oklüzyon ve reperfüzyon süresi boyunca beyin kan akımındaki değişimleri anlık olarak ölçebilmek için Laser Doppler flowmetre (Perimed, İsveç) cihazı kullanılmıştır. Cihazın fiberoptik probu, Bregma'nın -2 mm posterior ve 6 mm laterali olacak şekilde hasarlı hemisferde direkt kafatası kemiği üzerine dental yapıştırıcı ile sabitlenmiştir. Orta serebral arter oklüzyonu modeli oluşturmak için monofilament tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte, boyun bölgesine yapılan kesi sonrası, karotid arterler izole edilmiş ve 6-0 ipek (S1165, Doğan, Türkiye) ipele ligasyon yapılmıştır. Geçici olarak damarı tıkmak için mikrovasküler klips internal karotid üzerine yerleştirilmiş, kommon karotid artere damar makası ile kesik atılmış ve 7-0 kalınlığındaki monofilament (701934PK5Re, Doccol, ABD) kesikten internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itilmiştir. Orta serebral arterin doğru olarak tıkanıp tıkanmadığı Laser Doppler flowmetre (Perimed, Stockholm, Sweden) cihazı yardımı ile beyin kan akımındaki düşüştürme kontrol edilmiştir. Oklüzyondan 30 dakika sonra ip geri çekilmiş, reperfüzyonun takip edilmesi amacıyla kan akımı 20 dakika daha takip edilmiştir. İskemi bitişinden 3 gün sonra fareler tekrar gaz anestezide alınmış ve içerisinde PBS, CDNF veya MANF (PBS içinde 1 µg/gün) bulunan ozmotik pompalara (Alzet 2004; Alzet) bağlı kanüller (Brain infusion kit 3, Alzet, ABD) farelerin sol lateral ventrikülüne yerleştirilmiştir. Fareler, ozmotik pompanın çıkarılacağı iskemi sonrası 28. güne kadar günlük olarak gözlemlenmiş ve herhangi bir serebral kanama veya enfeksiyon görülmemiştir. Fareler, iskemiden 42 gün sonra tekrar gaz anestezide alınmış, aksonal projeksiyon ile ilgili traserlerin uygulanması amacıyla ozmotik pompalar çıkarılmış ve farelerin motor kortekslerine enjeksiyon yapılmıştır (177).

## 5.3. Deneyin sonlandırılması ve beyinden örnek alınması

Konvensiyonel immunohistokimya metodu için her gruptan 6 fareye iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra % 0,9 NaCl ile transkardiyak perfüzyon uygulanmıştır. Beyinler kuru buz üzerinde hızla dondurulmuş ve Bregma seviyesinden 18 µm'lik koronal kryostat kesitleri alınmıştır (177).

## 5.4. İmmünohistokimya

Her bir boyama için tüm gruplardaki her bir hayvandan alınan kesitler klasik immünohistokimya yöntemi ile boyanmıştır. Bunun için -80 °C'den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra % 4'lük paraformaldehit (PFA, 1040051000, Merck, ABD) solüsyonunda 7 dakika bekletilen kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde yıkandıktan sonra uygun serumlarla 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Kesitler 1 saatin sonunda uygun primer antikorlarla gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün sabah, kesitler PBS çözeltisinde tekrar yıkandıktan sonra uygun sekonder antikorlar ilave edilmiş ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Benzer şekilde yıkanan kesitlere daha sonra hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için 4',6-diamidine-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) boyaması yapılmıştır. Boyamaların ardından kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmış ve kesitler konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntülenen kesitlerin analiz için fotoğrafları çekilmiştir. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için, çekilen fotoğraflarda striatum bölgesinden 6 alan, hem ipsilateral hem de kontralateral bölgede benzer yerler olacak şekilde belirlenmiş ve boyama pozitif hücreler sayılarak her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (177).

### 5.4.1. *İn-sitü* Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile DNA kırıklarının belirlenmesi

İmmünohistokimya çalışmaları için alınan kesitlerden DNA kırıklarının *in sitü* olarak tanınması ve zamana bağlı hücre ölümünün belirlenmesi için TUNEL kiti (11684795910, Roche, ABD) kullanılarak apoptotik hücre tayini yapılmıştır. Kısaca, -80 °C'den çıkarılan kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, sonrasında % 4'lük PFA solüsyonu içerisinde önce oda sıcaklığında 10 dakika daha sonra da +4 °C'de 10 dakika daha olmak üzere bekletilmiştir. Fiksasyon bitiminde kesitler PBS çözeltisinde yıkanmıştır. Membran geçirgenliğini sağlayabilmek için kesitler 2 dakika buz üzerinde Triton-X-100 (X100, Sigma Aldrich, ABD) deterjan ve tri-sodyumsitrat di-hidrat (1.064.481.000, Merck, ABD) içeren solüsyonda daha sonra da 1 dakika boyunca 750 Watt mikrodalga içerisinde tri-sodyumsitrat di-hidrat pH 6,0 solüsyonda inkübe edilmiştir. Kesitler PBS çözeltisinde yıkanmıştır. Uygun bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen kesitler, sonrasında

enzim ve substrat içeren TUNEL karışımı içerisinde 70 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Son olarak hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için iskemik striatumda 6 alan belirlenmiş, fotoğraflanmış ve TUNEL (+) hücreler sayılarak her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (178).

#### **5.4.2. Post-iskemik atrofinin belirlenmesi**

Uzun dönemde striatum ve korpus kallozumdaki post-iskemik atrofinin belirlenmesi için 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvandan alınan kesitlere *Cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Kısaca -80 °C’den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş, daha sonra % 4’lük PFA solüsyonunda 15 dakika inkübe edilmiştir. PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra 2 dakika masa üzerinde, sonrasındaki 13 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde *Cresyl violet* boyası ile muamele edilmiştir. Kesitler boyamadan hemen sonra her birinde beşer saniye inkübe edilecek şekilde sırasıyla % 70, % 90, % 95 ve % 100’lük etanol serisinden geçirilmiştir. Alkol serisinden sonra boyanın fikse olması için ksilen solüsyonuna alınan kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmıştır. Görüntüleme, ışık mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Alınan görüntülerde kontralateral striatum, ipsilateral striatum ve korpus kallozum alanları ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı ile ölçülmüş, kontralateralden ipsilateralın çıkarılması ile birlikte hasar sonrası oluşan atrofi hesaplanmıştır (177).

#### **5.4.3. Hücre farklılaşmasının BrdU ile belirlenmesi**

İskemi sonrası yeni oluşan ve farklılaşan hücreleri takip edebilmek için deney hayvanlarına, beyin felci hasarının oluşturulmasından üç gün sonra başlamak üzere, üçer gün aralıklarla intraperitoneal yolla 100 mg/kg dozunda 5-bromo-2’-deoksiüridine (BrdU, B5002, Sigma Aldrich, ABD) verilmiştir. Elli beş günün sonunda farelere yüksek doz anestezi altında serum fizyolojik ile perfüzyon ve % 4’lük PFA ile fiksasyon yapılmıştır. Farelerin beyinleri çıkarılmış, çıkarılan beyinler +4 °C’de 3 saat daha % 4’lük PFA çözeltisinde inkübe edilmiş, son olarak da % 30’lük sükröz çözeltisinde +4 °C’de çökene kadar bekletilmiştir. Çöken beyinler kuru buz

üzerinde dondurulmuş ve cryostat cihazı kullanılarak bregma seviyesinden 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Tüm gruplardaki her bir hayvan için kesitler immünohistokimya bölümünde (5.4. İmmünohistokimya) belirtilen şekilde boyanmıştır. BrdU'nun DNA'nın yapısına katılması sebebiyle boyamanın gerçekleştirilebilmesi için klasik immünohistokimya metodundan farklı olarak 2 N HCl kullanılmış ve DNA'nın parçalanması sağlanmıştır. GFAP/BrdU ve NeuN/BrdU boyamalarının yapılabilmesi için % 4'lük PFA ile fiksasyon aşamasından sonra kesitler 15 dakika kaynayan sodyum sitrat çözeltisi içerisinde kaynatılmış, daha sonra da 15 dakika boyunca oda sıcaklığındaki çözelti içerisinde soğumaya bırakılmıştır. Sitrat aşamasından sonra kesitler PBS çözeltisinde yıkanmış, daha sonra GFAP veya NeuN antikorları ile boyamaları ayrı ayrı yapılmıştır. Son olarak da BrdU boyaması aşamasına geçilmiştir. GFAP (3656, Cell Signaling Technologies, CST, ABD) veya NeuN (MAB377C3, Merck, ABD) primer antikorlarının inkübasyonu bittikten sonra kesitler PBS çözeltisinde yıkanmış, 37 °C'de 1 saat boyunca 2 N HCl solüsyonunda inkübe edilmiştir. Bölüm 5.4'te açıklandığı gibi, 1 saat oda sıcaklığında bloklama, 1 saat oda sıcaklığında BrdU primer antikor (ab6326, Abcam, ABD) ile inkübasyon ve uygun sekonder antikorla inkübasyon aşamalarından sonra hücre çekirdeğini görüntüleyebilmek için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için iskemik hemisferde 24 alan belirlenmiş, fotoğraflanmış ve GFAP/BrdU ve NeuN/BrdU immünoboyama pozitif hücreler sayılarak her bir grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (179).

#### **5.4.4. Boyanan kesitlerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi**

Boyanan kesitlerin görüntülenmesi ve analizi için aksi belirtilmeyen tüm kesitlerde konfokal (LSM 780; Zeiss, Almanya) mikroskop kullanılmıştır. Program tarafından kontrol edilen motorize tabla sayesinde x-y-z düzlemlerinde otomatik hareket sağlanmış, görüntüleme aşamasında kesitte bulunan herhangi bir hücre çekirdeğini fokus farkı yüzünden kaçırmamak için z düzleminde farklı fokuslardan görüntüler alınmış ve alınan görüntülerin hepsi Zen Black programı kullanılarak *maximum intensity projection* (maksimum yoğunluk projeksiyonu) modunda birleştirilmiştir. Programın *tile* (görüntüleri yanyana birleştirme) ve *z-stack* (farklı



fokuslardan görüntü alabilme) fonksiyonlarını kullanarak ipsilateral hemisferden görüntüler alınmıştır (177).

#### **5.4.5. Glial yaranın değerlendirilmesi**

Glial yaranın değerlendirilebilmesi için daha önce GFAP/BrdU boyanan kesitlerin tüm hasarlı hemisferleri konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Daha sonra Zen Blue (version 2012; Carl Zeiss, Almanya) programı kullanılarak iskemik hemisferdeki glial yara alanı ölçülmüştür. Her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (177).

### **5.5. Hücre içi sinyal yolları ile ilgili proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle belirlenmesi**

Protein ekspresyon çalışmaları için iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları izole edilmiştir. Dokular protein izolasyonuna kadar -80°C'de saklanmıştır.

#### **5.5.1. Protein İzolasyonu**

-80 °C'den çıkartılan dokulara lizis solüsyonu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 M EDTA, *protease inhibitor cocktail*; 20-201, Millipore, ABD) ilave edilmiş ve dokular homojenizatör (Silent Crusher S.; Heidolph, Almanya) yardımıyla homojenize edilmiştir. Örnekler 20 dakika buz üzerinde inkübasyonun ardından 14000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar (üst faz) pelletlerden ayrılarak alıkotlanmıştır (177, 178).

#### **5.5.2. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi**

Protein konsantrasyonları Qubit® Protein çalışma kiti (Q33211; Invitrogen, ABD) kullanılarak Qubit Fluorometer 2.0 (Q32866; Invitrogen, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. Örnekler, konsantrasyon ölçümlerine göre eşitlenip 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplanmış, 2X Laemmli buffer (161-0737; Bio-Rad, ABD) ile karıştırılıp 70 °C'de 10 dakika bekletilmiş, daha sonra hemen +4 °C'deki kırık buzun üzerine alınmıştır.

### 5.5.3. Western Blot

Örnekler Any kD™ Mini-PROTEAN jelin (456-9036, Bio-Rad, ABD) her bir kuyucuğuna 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklenerek 50 V'da 5 dakika, daha sonra 100 V'da bir saat ve en son 150 V'da bir saat daha yürütülmüştür. Ardından Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti kullanılarak (170-4272; Bio-Rad, ABD) jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanmış % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat bloklamamın ardından +4 °C'de gece boyu bloklama solüsyonunda seyreltilen primer antikor (p-AKT,4060, CST; p-p44/42, 9101, CST; p-p38, 9211, CST; p21, 92675, Abcam; Versican, MABT161, Merck; eNOS, ab66127, Abcam veya iNOS, ab15323, Abcam) ile inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanan membranlara bloklama solüsyonunda hazırlanan sekonder antikor ilave edilmiş ve membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bantların görüntülenmesi için deteksiyon solüsyonu (Clarity™ Western ECL Substrate, 1705060, Bio-Rad, ABD) eklenmiş ve membranlar, ChemiDoc MP (Biorad) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

### 5.5.4. Stripleme

Membranlar strip solüsyonu ile muamele edilerek 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanarak, bloklama aşamasından itibaren izlenen protokol farklı bir antikor (t-p44/-42, 9102, CST; t-p38, 9212, CST veya Beta-aktin, 4970, CST) kullanılarak tekrar edilmiştir. Örneğin; Fosfo-Akt antikoruna ile muamele edildikten sonra stripleme yapıp aynı antikorun totaline (total-Akt) bakılmıştır.

### 5.5.5. Değerlendirme ve istatistik

Tüm sonuçlar ImageJ programında analiz edilmiştir. Her bir proteinin optik yoğunluk değerinden arka plan (*background*) çıkartıldıktan sonra, değerler endojen kontrol olarak kullanılan beta-aktin proteinine göre optimize edilmiştir. Kontrol, CDNF veya MANF tedavi grupları arasındaki zamana bağlı değişimler tek-yönlü varyans analizi (*One-Way ANOVA*) ve akabinde Fisher LSD post-hoc testi kullanılarak

SPSS programında belirlenmiştir.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## **5.6. qPCR yöntemi ile gen miktarındaki değişikliklerin belirlenmesi**

Gen ekspresyon çalışmaları için, fareler iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Beyinlerden kuru buz üzerinde bregmadan 2 mm kaudal ve 2 mm rostral bloklar halinde kesitler alınmıştır. Bu bloklardan ipsilateral striatum ve kontralateral striatumlardan örneklerden aynı grupta olanlar birleştirilmiştir. Birleştirilen dokular RNA izolasyonuna kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  de saklanmıştır. RNA izolasyonu için alınan ve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  de saklanan beyin dokularından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qPCR gen ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Anti-enflamatuvar etkili genler ( $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$ ), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9), plastisiteyi uyaran ve hücre yaşamını etkileyen genler (GAP43, CNTF, BDNF, CDNF, MANF) ve plastisiteyi etkileyen genler (Ncam1, Ephrin A5, Ephrin B1, Versican, Ncan, Ntn1) olmak üzere toplam 17 gendeki değişiklikler incelenmiştir.

### **5.6.1. RNA izolasyonu**

14, 28 ve 55. gün sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan beyin dokularından RNA izolasyonu Qiagen AllPrep RNA/DNA/Protein İzolasyon kiti kullanılarak (80004; Qiagen, ABD) yapılmıştır. Dokular, kit içinden çıkan protokole uygun olarak, 600  $\mu\text{L}$  RLT lizis tamponu içinde cam homojenizatör ile ezilerek ve ardından 21G uçlu şırıngadan geçirilerek homojenize edilmiştir. 18.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek üstte kalan faz alınmış ve kitten çıkan DNA spin kolonuna yüklenmiştir. Kolondan akan sıvı faza aynı hacimde % 70'lik etil alkol ilave edilmiştir. Süspansiyon, kit içinden çıkan RNeasy spin kolonuna yüklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon, kit ile hazır gelen RW1 yıkama çözeltisi ile 1 defa, ardından RPE yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır. Kuruması için temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınan kolon, boş olarak 18.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, kolonun altına yeni bir temiz mikrosantrifüj tüp yerleştirilmiş ve kolona 50  $\mu\text{l}$  RNase içermeyen su ilave edilerek 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA'lar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (96, 179).

### 5.6.2. cDNA sentezi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu Implen P330 NanoPhotometer cihazı kullanılarak, OD<sub>260</sub> ölçümü üzerinden hesaplanmış ve tüm örneklerin saflığı (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ve OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>) tayin edilmiştir. Hesaplanan değerlere göre, komplementer DNA (cDNA) sentezi için her bir örnekten 1 µg RNA alınarak ve Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak (04896866001; Roche, ABD) cDNA sentezi yapılmıştır.

**Tablo 5.6.2.1** cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları

	1 Reaksiyon için (µl)	25 Reaksiyon (µl)
Rev. Trans. Buffer (5X)	6	150
dNTP mix (25X)	3	75
Rev.Trans. Enzim	0,75	18,75
RNase Inhibitor	0,75	18,75

Kullanılan kit için önerilen protokole uygun olarak, 0,2 µL'lik PCR tüplerinde 1 µg RNA'ya karşılık gelen hacim, random primerler ve oligo(dT) primerler ile karıştırılmış ve bir termal döngü cihazında (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, ABD) 65 °C'de 10 dakika inkübe edilerek buz üzerine alınmıştır. Ardından, yukarıdaki tabloda belirtildiği gibi 24 reaksiyon için ana karışım hazırlanmış ve reaksiyon başına 10,5 µl olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Böylece reaksiyon başına her bir tüpte total hacim 30 µl olmuştur. Reaksiyon, termal döngü cihazına tekrar alınmış, 50 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından enzimin inaktivasyonu için 80 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri, qPCR çalışmasında kullanılmak üzere 1:10 oranında RNA ve DNA içermeyen su ile seyreltilmiştir. Stok çözeltiler -80 °C'de saklanmıştır.

### 5.6.3. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve kullanılan primerler

Gen ekspresyon çalışmaları için, Bio-Rad *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (1725270, Bio-Rad, ABD) karışımı ile yine Bio-Rad markalı CFX Connect Real Time System cihazı kullanılmıştır.

**Tablo 5.6.3.1.** Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri

Gen adı	DNA dizisi
GAPDH	F: 5' – AGGTCGGTGTGAACGGATTTG – 3' R: 5' – TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA – 3'
$\beta$ -aktin	F: 5' – GGCTGTATTCCCCTCCATCG – 3' R: 5' – CCAGTTGGTAACAATGCCATG – 3'
IL-1 $\beta$	F: 5' – GCAACTGTTCTGAACTCAACT – 3' R: 5' – ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT – 3'
TNF $\alpha$	F: 5' – CCCTCACACTCAGATCATCTTCT – 3' R: 5' – GCTACGACGTGGGCTACAG – 3'
TGF $\beta$ 1	F: 5' – CTCCCGTGGCTTCTAGTGC – 3' R: 5' – GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG – 3'
VEGF-B	F: 5' – GCCAGACAGGGTTGCCATAC – 3' R: 5' – GGAGTGGGATGGATGATGTCAG – 3'
VEGF-A	F: 5' – ACCATGAACTTTCTGCTCTCTTG – 3' R: 5' – GAACTTGATCACTTCATGGGACT – 3'
MMP9	F: 5' – CTGGACAGCCAGACACTAAAG – 3' R: 5' – CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG – 3'
GAP43	F: 5' – TGGTGTCAAGCCGGAAGATAA – 3' R: 5' – GCTGGTGCATCACCTTCT – 3'
CNTF	F: 5' – TCTGTAGCCGCTCTATCTGG – 3' R: 5' – GGTACACCATCCACTGAGTCAA – 3'
BDNF	F: 5' – TCATACTTCGGTTGCATGAAGG – 3' R: 5' – AGACCTCTCGAACCTGCCC – 3'
CDNF	F: 5' – CTTTTGCGCCGGGTTTTGTAT – 3' R: 5' – AGGGAGTTGTAGAATCGGTCTAA – 3'
MANF	F: 5' – TCTGGGACGATTTTACCAGGA – 3' R: 5' – TCTTGCTTCACGGCAAACTTTA – 3'
Ncam1	F: 5' – ACCACCGTCACTCACTAACTCT – 3' R: 5' – TGGGGCAATACTGGAGGTCA – 3'
Efrin A5	F: 5' – ACACCGTACATGAGTCAGCC – 3' R: 5' – ACGGGAGGAGACTGTGCTAT – 3'
Efrin B1	F: 5' – TGTGGCTATGGTCGTGCTG – 3' R: 5' – CCAAGCCCTTCCCACTTAGG – 3'
Versican	F: 5' – TTTTACCCGAGTTACCAGACTCA – 3' R: 5' – GGAGTAGTTGTTACATCCGTTGC – 3'
Nörocan	F: 5' – TGCAACCACGGCTAAGCTC – 3' R: 5' – GGGGATAAGCAGGCAATGAC – 3'
Netrin-1	F: 5' – TGTGTCAGCGGACTTCCTTC – 3' R: 5' – AGGAACACTGGCCCAAACAA – 3'

Tablo 5.6.2.1’de belirtilen oranda her bir cDNA örneği ve gen için ana karışım, cDNA olmaksızın hazırlanarak 96’lık real time PCR plakasına (*Hard Shell PCR Plate*, HSP9601, Bio-Rad, ABD) 9’ar µl olarak dağıtılmıştır. Daha sonra uygun cDNA örnekleri kuyucuklara eklenmiştir. Örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde plakalara yüklenmiştir. PCR reaksiyonu, uygun termal profile (98 °C’de 30 sn, [95 °C’de 15 sn, 60 °C’de 30 sn] x 40 döngü; ardından melt analysis için 55 °C’den 95 °C’ye 0,5 sn) gerçekleştirilmiştir. Kullanılan genler ve primer çiftlerinin DNA dizileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

#### 5.6.4. qPCR Analizi

Real time PCR analiz çalışmaları için Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazının CFX Manager programı kullanılmıştır. Cihazdan ham veriler (Ct değerleri) alınarak kontrol (sadece araç uygulanan grup), MANF ve CDFN uygulanan gruplar için 3 farklı zaman noktasında 17 genin verileri hem ipsilateral hem de kontralateral bölgeler için olmak üzere ayrı ayrı düzenlenmiştir. *Cycle threshold* (Ct) değerleri, 2 endojen (GAPDH ve β-aktin) kontrole göre normalize edilerek [ $\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT((GAPDH + \beta\text{-aktin})/2)$ ]  $\Delta Ct$  değeri hesaplanmıştır. Her bir zaman noktasında, kontrolün  $\Delta CT$  değeri kalibratör olarak kullanılmış ve [ $\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{örnek}) - \Delta CT(\text{kalibratör})$ ] formülüne göre  $\Delta \Delta CT$  değeri hesaplanmıştır. Grupların kontrollerine göre kat değişimleri, relatif kantifikasyon (RQ) formülü uygulanarak [ $2^{-\Delta \Delta Ct}$ ] hesaplanmıştır. MANF veya CDFN uygulanan gruplar, her bir zaman noktasında ve ipsilateral ve kontralateral hemisferler için kendi kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Kontrol, CDFN veya MANF tedavi grupları arasındaki zamana bağlı değişimler tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve akabinde Fisher LSD post-hoc testi kullanılarak SPSS programında belirlenmiştir.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 5.7. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili testler

Fonksiyonel nörolojik iyileşme operasyondan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan davranış testleri ile değerlendirilmiştir. İlk davranış testleri beyin felcinden önce taban çizgi (*baseline*) oluşturmak amacıyla yapılmıştır.

### **5.7.1. El çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi**

Bu test sırasında sol pençeler tıbbi bant (3M transpore tıbbi flaster, 1527, 3M, ABD) ile fikse edilerek her iki ön pençenin kavrama gücü veya sağ ön tek pençenin kavrama gücü ölçülmüştür. Bu test için ucuna üçgen çelik tel tutturulan yaylı bir Newton metre (Medio-Line Spring Scale, metric, 300 g, Pesola AG, Switzerland) kullanılmıştır. Fareler yaklaştırdıklarında üçgen teli içgüdüsel olarak tutmakta ve kuyruklarından geriye çekildiklerinde kavrama güçleri oranında bırakmamaya çalışmaktadırlar. Kontrol, CDNF veya MANF uygulanan farelere bu test uygulanmış ve bırakmak zorunda kaldıkları güç kaydedilmiştir. Farelerin sağlam olan sol eli bantla bağlanarak felçli sağ elin kavrama gücü Newton cinsinden hesaplanmıştır. Her test 5 kez tekrarlanmış ve ortalama değer alınmıştır. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (177).

### **5.7.2. RotaRot ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi**

Beyin felci sonrasındaki motor koordinasyonlardaki değişimlerin belirlenmesi amacıyla fareler kendi çevresinde hızı giderek artan (4'den 40 rpm'ye 245 saniyede) bir silindir üzerine yerleştirilmiş ve farelerin bu silindir üzerinde kalabildikleri süre değerlendirilmiştir. Her test 5 kez tekrarlanmış ve ortalama değer alınmıştır. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (177).

### **5.7.3. Yükseltilmiş O-labirenti ile anksiyetenin değerlendirilmesi**

Spontan motor davranışı, endişe ve korkuyu ölçmek için kullanılan bu test 5,5 cm genişlikte ve yerden 40 cm yükseklikte, dış çapı 46 cm olan yuvarlak bir PVC daireden oluşmaktadır. 90°'lik karşılıklı iki bölge PVC den yapılmış 16 cm yükseklikte iç ve dış duvarlarla korunmaktadır (Kapalı bölüm). Kalan 90°'lik iki bölge açık bölgedir. Hayvanlar kapalı bölgelerden birine bırakılmış ve 10 dakika gözlenmiştir. Hayvanlar 4 ayağı ile birlikte tamamen bir bölgeye girdiğinde hayvanların o bölgeye geçtiği kabul edilmiş ve o bölgede bulunduğu süre başlatılmıştır. Hayvanların korunmasız bölgelerde geçirdiği süre davranış, endişe ve

korku belirtisi olarak değerlendirilmektedir. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (177).

#### **5.7.4. Açık alan testi ile motor aktivitelerin değerlendirilmesi**

Farelerin spontan motor aktivitelerinin ve alandaki araştırma benzeri davranışlarının değerlendirildiği bir metottur. 150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde bir ucu kapalı silindirden oluşan bir alanda fareler 10 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Kameraya bağlı bir bilgisayar ile Anymaze programı kullanılarak silindir sanal olarak 3 bölgeye ayrılmış ve farelerin hem bu bölgelere giriş çıkış süreleri hem de bu bölgelerde geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (177).

#### **5.8. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın belirlenmesi**

Uzun dönemde aksonal projeksiyonun belirlenmesi için, 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvana 42. gün davranış deneyleri bittikten sonra anterograd trakt traseri olan Biyotinlenmiş Dekstran Amin (BDA) enjeksiyonu yapılmıştır. BDA enjekte edilen farelere enjeksiyondan 10 gün sonra daha önce belirtilen şekilde % 0,9'luk NaCl ile transkardiyal perfüzyon uygulanmıştır. Daha sonra farelerin beyinleri çıkarılmış, çıkarılan beyinler +4 °C'de 3 saat daha % 4'lük PFA çözeltisinde inkübe edilmiş, son olarak da % 30'luk sükröz çözeltisinde +4 °C'de çökene kadar bekletilmiştir. Çöken beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuş ve kryostat cihazı kullanılarak fasiyel nükleus seviyesinden (Bregma -5.8 ile - 6.3 mm arası) 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler boyama yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır. -80 °C'dan çıkarılan kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisinde yıkandıktan sonra normal keçi serumla 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama sonrası kesitler 90 dakika boyunca oda sıcaklığında strepavidin bağlanmış AlexaFluor 555 (S21381, Invitrogen, ABD) ile konjuge edilmiş sekonder antikorla inkübe edilmiştir. Boyamaların ardından kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmış ve görüntüleme işlemi Axiozoom (Zeiss, Almanya) floresan mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. İki



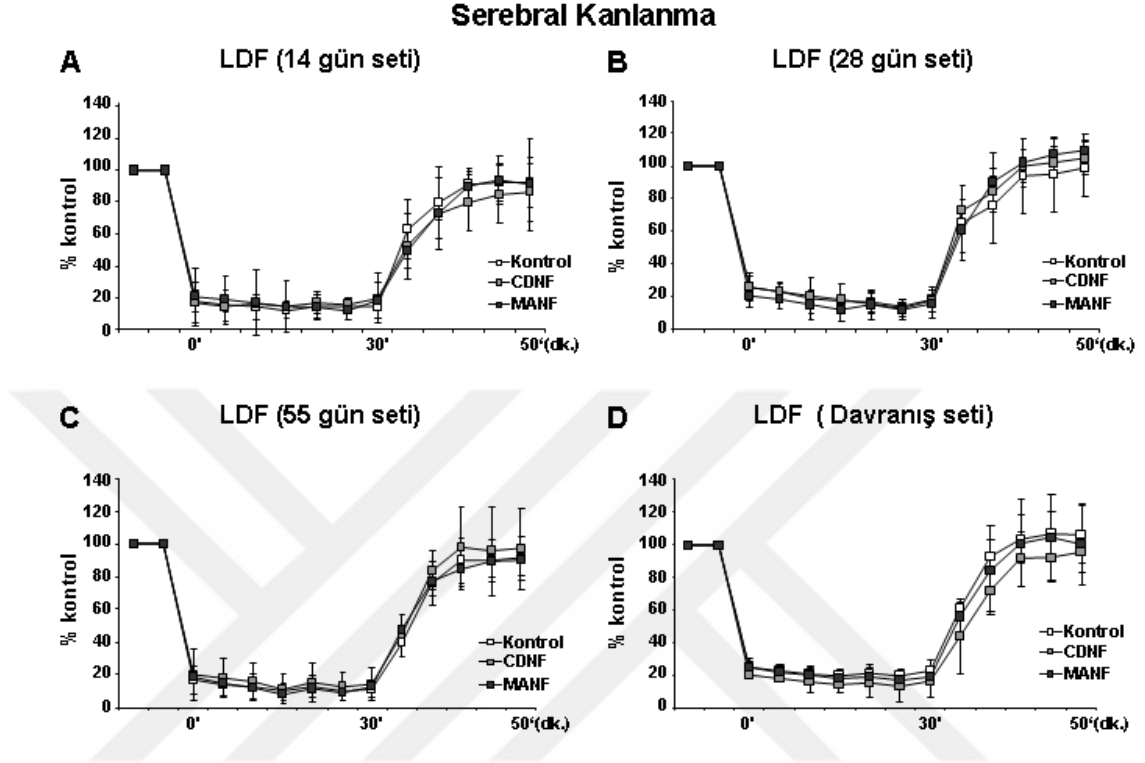
hemisfer arasındaki orta hattan çizilen 1000 µm'lik sanal çizgiyi (Şekil 6.21. kırmızı ile gösterilen çizgi) geçen aksonlar sayılmış ve her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (177).

## 5.9. İstatistik

Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla SPSS programı kullanılarak istatistiksel testler yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü (*one-way*) varyans analizi (*Analysis of variation, ANOVA*) kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edilmiştir (*least significant difference, LSD test*). Davranış deneylerinde sonuçların zamana bağlı olarak değerlendirilmesi için tekrarlı ölçümler varyans analizi (*repeated measurements, ANOVA*) yapılmıştır. Bütün değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, \* $p < 0,05$  ve \*\* $p < 0,01$  istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir (177).

## 6. BULGULAR

### 6.1. Serebral kan akımının ölçülmesi

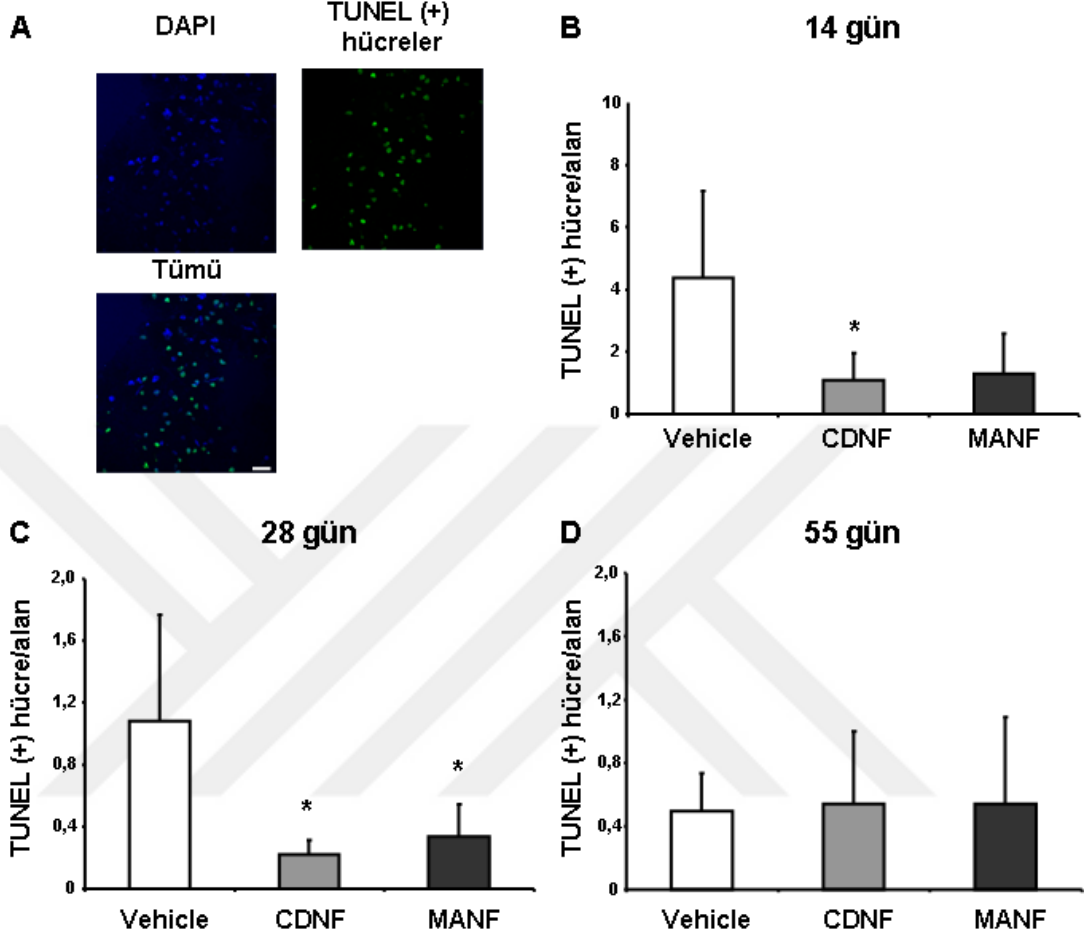


**Şekil 6.1.1.** Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı. 14 gün seti (A) 28 gün seti (B), 55 gün seti (C) ve davranış setleri için (D).

Deneyel iskemi modelinin oluşturulması, hasar süresinin kontrolü ve reperfüzyondaki kanlanmanın değerlendirilebilmesi için hayvanların serebral kan akımları Laser Doppler flowmetre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler iskemiden 15 dakika önce başlamış, 30 dakika iskemi ve 20 dakika reperfüzyon süresince devam etmiştir. Sonuçlar incelendiğinde herhangi bir zaman noktasında (14 gün, 28 gün, 55 gün ve davranış deney setleri için) serebral kan akımında gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 6.1.1.).

## 6.2. Apoptotik hücre sayısının değerlendirilmesi

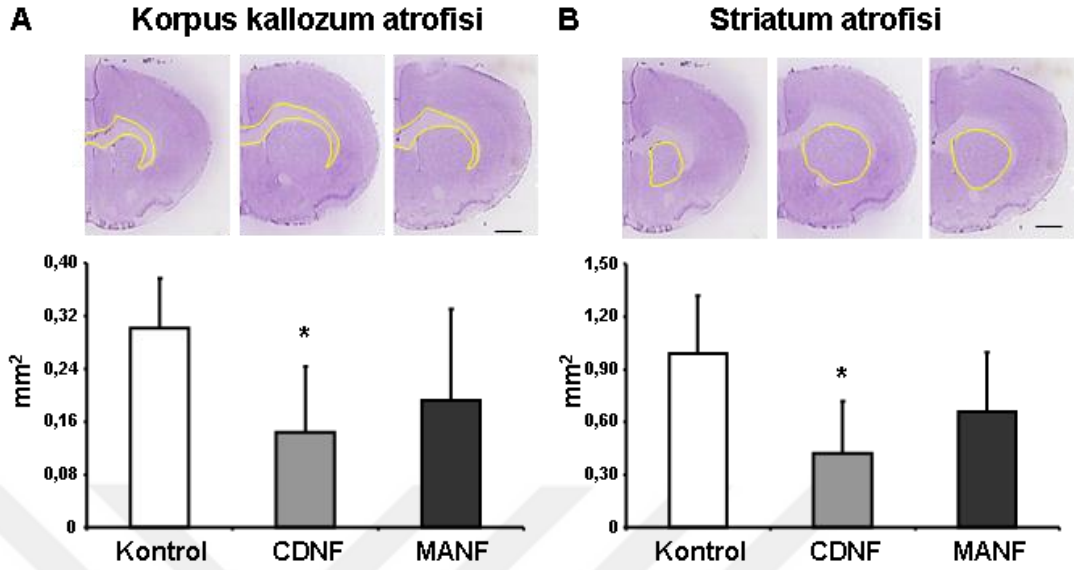
### DNA Kırıklarının Analizi



**Şekil 6.2.1.** Zamana bağlı olarak apoptoz değerlendirilmesi. Temsili TUNEL boyaması (A) ve günlere bağlı değerler, 14 gün (B), 28 gün (C) ve 55 gün (D).

Yapılan CDNF veya MANF tedavileri sonrası DNA kırıklarının değerlendirilmesi için alınan kesitler in-situ hücre ölümü tespit kiti (*in-situ Cell Death Detection kit*) kullanılarak boyanmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskopta (LSM760, Zeiss, Almanya) görüntülenmiş, striatumda belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Hem 14 gün hem de 28 gün sonra sonlandırılan deney setinde kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi apoptotik hücre ölümünü anlamlı derecede azaltmıştır (14. gün  $p=0,042$ , 28.gün CDNF  $p=0,13$ , MANF  $p=0,19$ ). 55 günlük deney setinde ise gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 6.2.1). Bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.

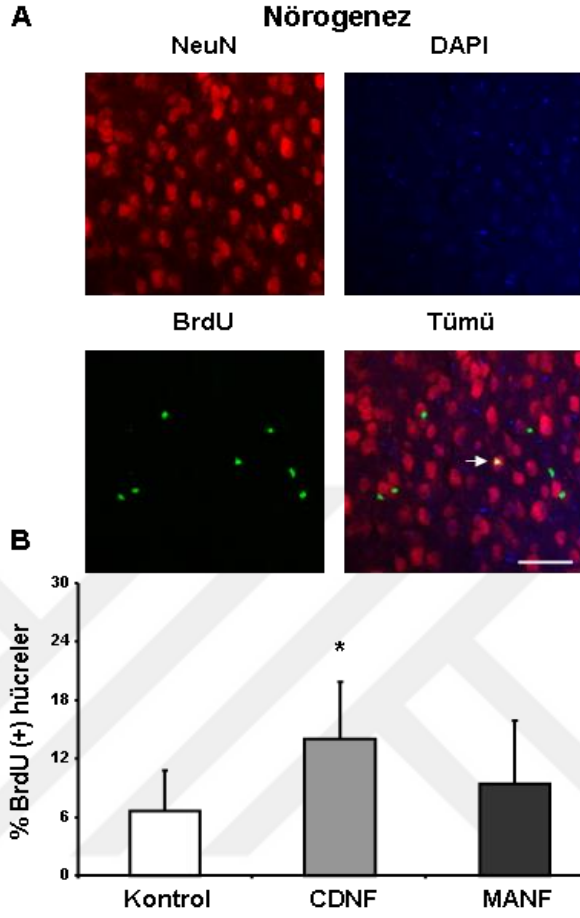
### 6.3. İskemi sonrası uzun dönemde atrofinin belirlenmesi



**Şekil 6.3.1.** Korpus kallozumdaki (A) ve striatumdaki (B) post-iskemik atrofinin *cresyl violet* boyaması yapılarak değerlendirilmesi.

Atrofinin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası kesitler fotoğraflanmış, hasarlı ve hasarsız korpus kollozumları ve striatumları Image J programı kullanılarak ölçülmüştür. Hasarsız ölçülen alandan hasarlı alanın çıkarılması ile atrofi alanları hesaplanmış ve grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi hem korpus kollozum hem striatumdaki atrofiyi anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 6.3.1., korpus kallozum  $p=0,049$ , striatum  $p=0,013$ ). Bar 500  $\mu\text{m}$ 'dir.

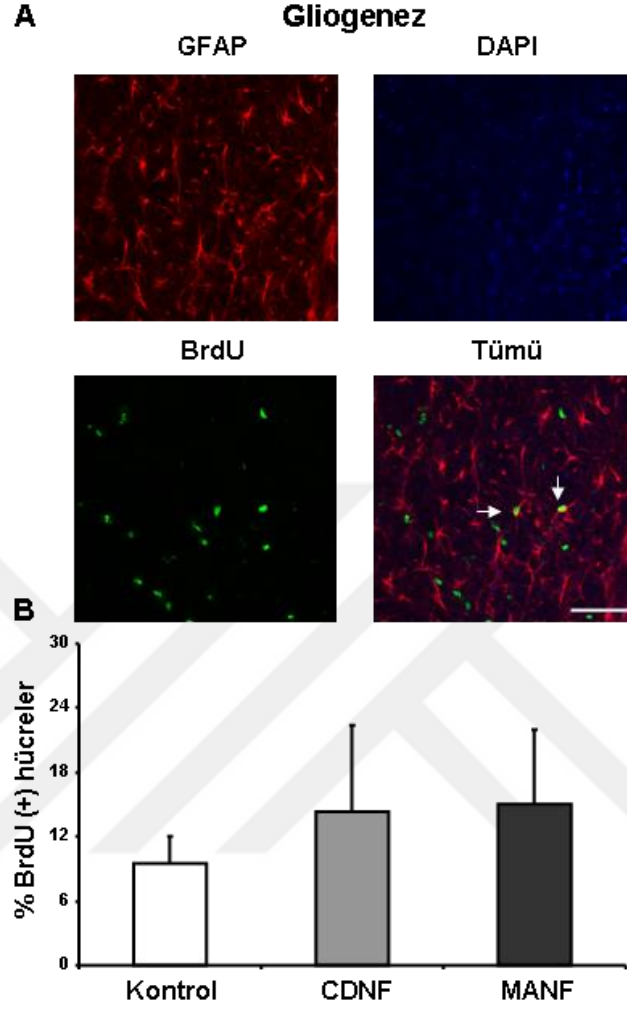
#### 6.4. Nörogenez belirlenmesi



**Şekil 6.4.1** Nörogenezin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/NeuN boyaması (A) ve değerler (B).

Nörogenez belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine NeuN+/BrdU+ ikili immünofloresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Nörogenez için iskemik hemisferde belirlenen alanlardaki NeuN ve BrdU boyamalarının üst üste geldiği hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi uzun dönemde nörogenezi istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 6.4.1.,  $p=0,047$ ). Bar 150  $\mu\text{m}$ 'dir.

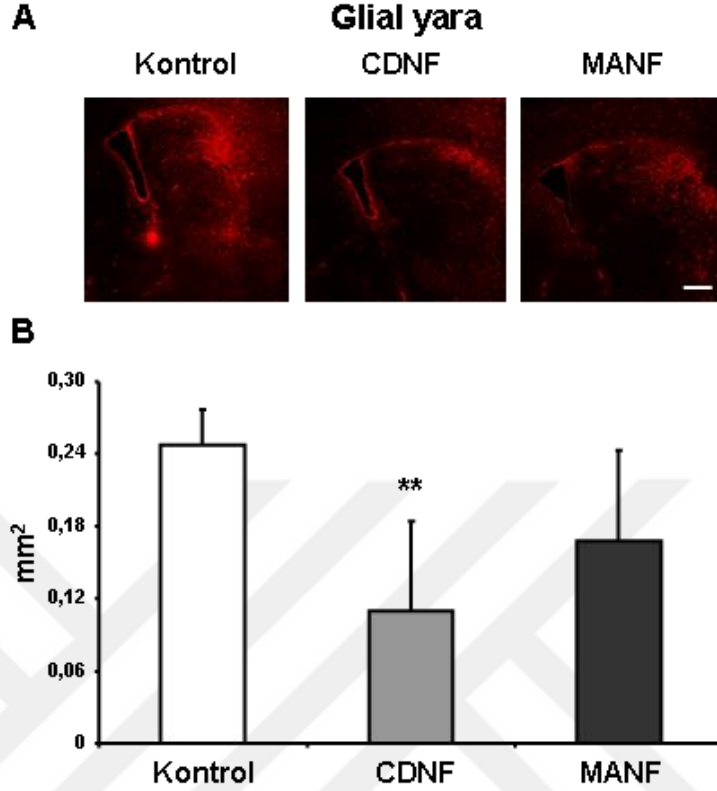
## 6.5. Gliogenezin belirlenmesi



**Şekil 6.5.1.** Gliogenezin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/GFAP boyaması (A) ve değerler (B).

Gliogenezin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine GFAP+/BrdU+ immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Gliogenez için iskemik hemisferde GFAP ve BrdU boyamalarının üst üste gelmiş olduğu hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında hem CDNF, hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da gliogenezini artırmıştır (Şekil 6.5.1). Bar 150  $\mu\text{m}$ 'dir.

## 6.6. Glial yaranın belirlenmesi

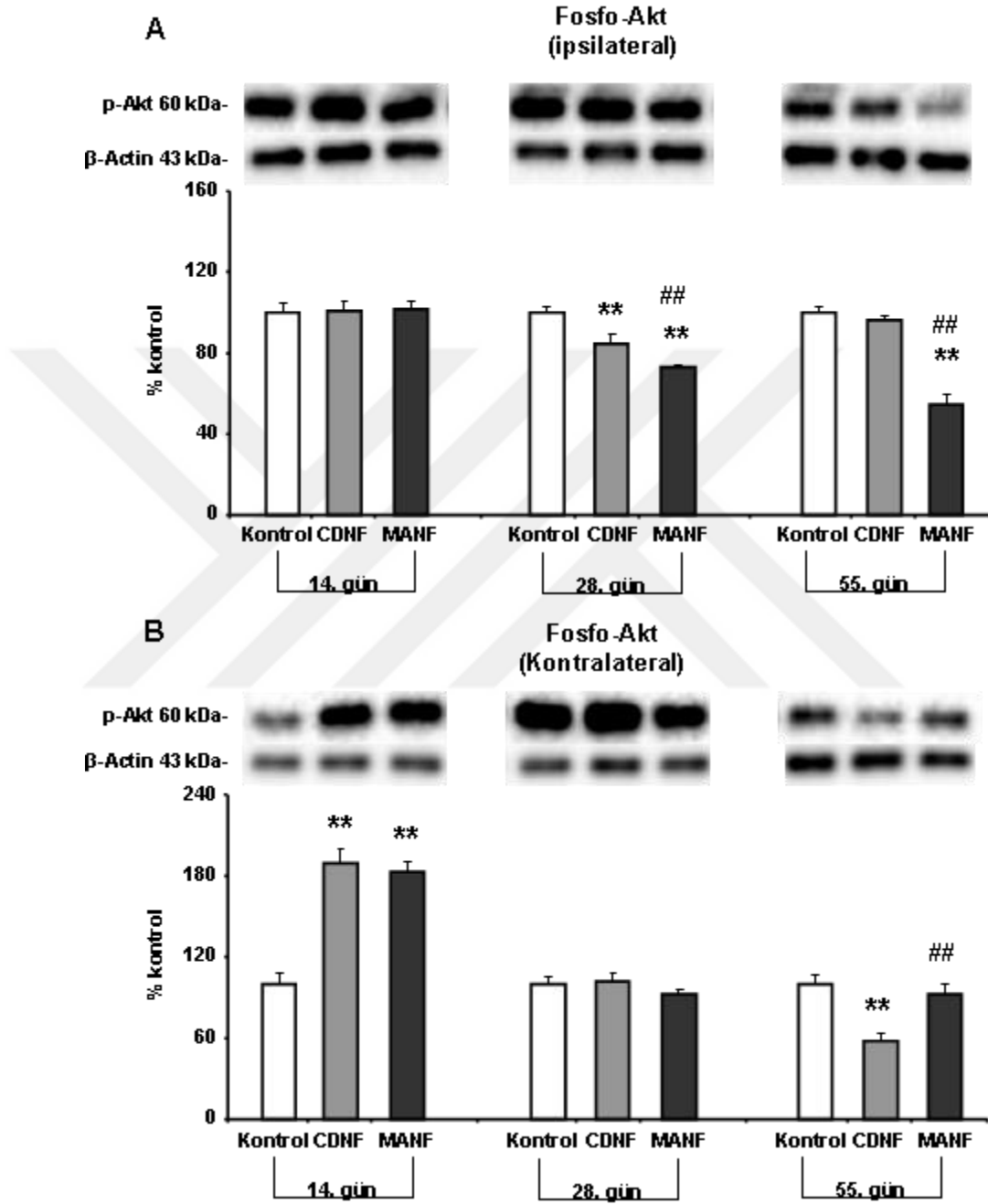


**Şekil 6.6.1** Temsili glial yara için GFAP boyaması (A) ve glial yara değerlendirilmesi (B).

Glial yaranın belirlenmesi için GFAP boyanan kesitlerin hasarlı hemisferi konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir. Glial yara alanı Zen Blue programı kullanılarak ölçülmüş ve grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi glial yarayı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.6.1.,  $p=0,003$ ). Bar 100  $\mu\text{m}$ 'dir.

## 6.7. İskemi sonrası protein seviyesindeki değişiklikler

### 6.7.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-Akt anlatımına etkisi



Şekil 6.7.1.1 İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-Akt anlatımına etkisi

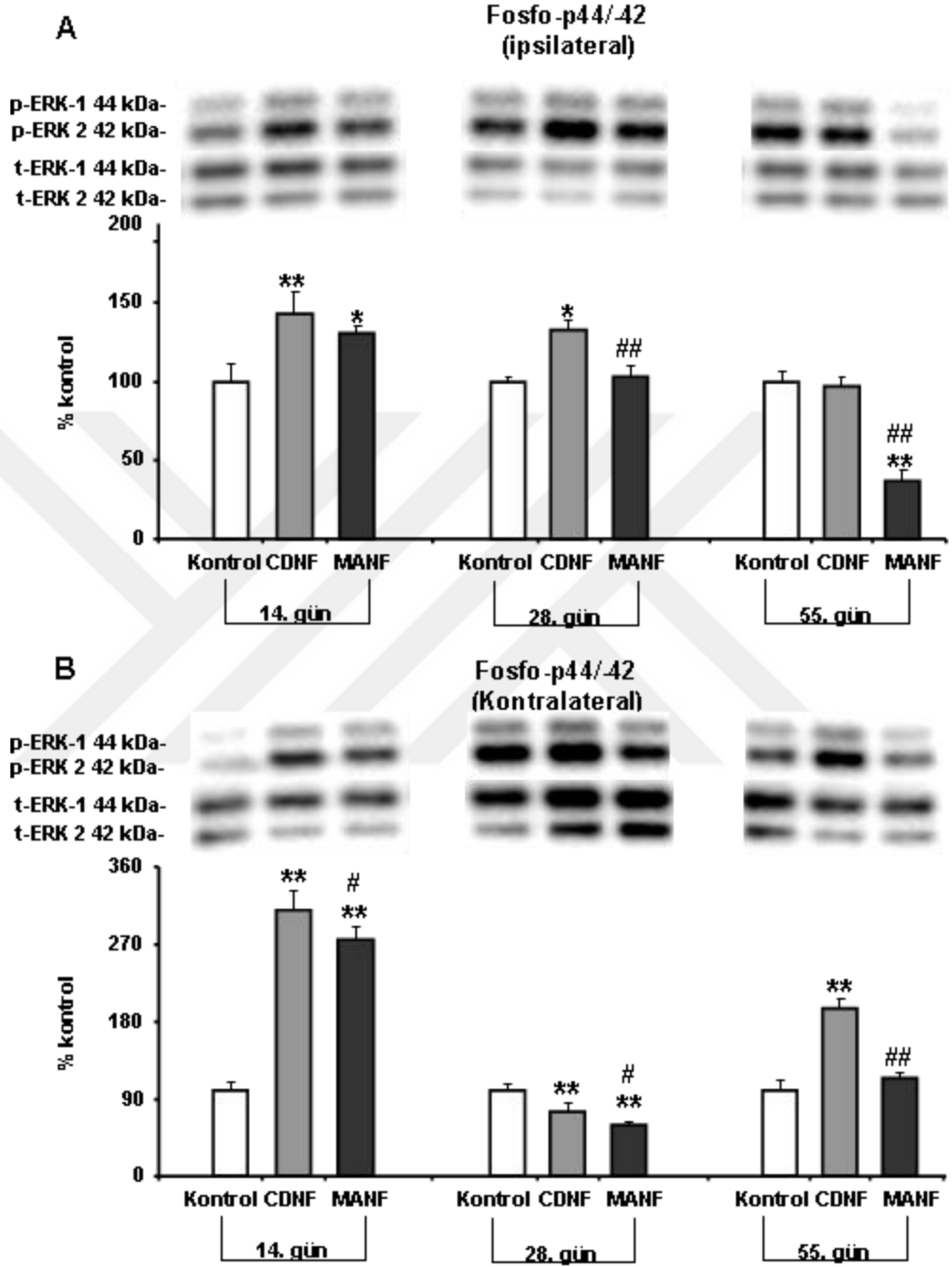


Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-Akt seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde ise MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-Akt seviyesini 14. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde ise CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırırken, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.7.1.1., \*\*p<0,01,##p<0,01).



6.7.2. İskemi sonrası CDNF ve MANSF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p44/-42 anlatımına etkisi



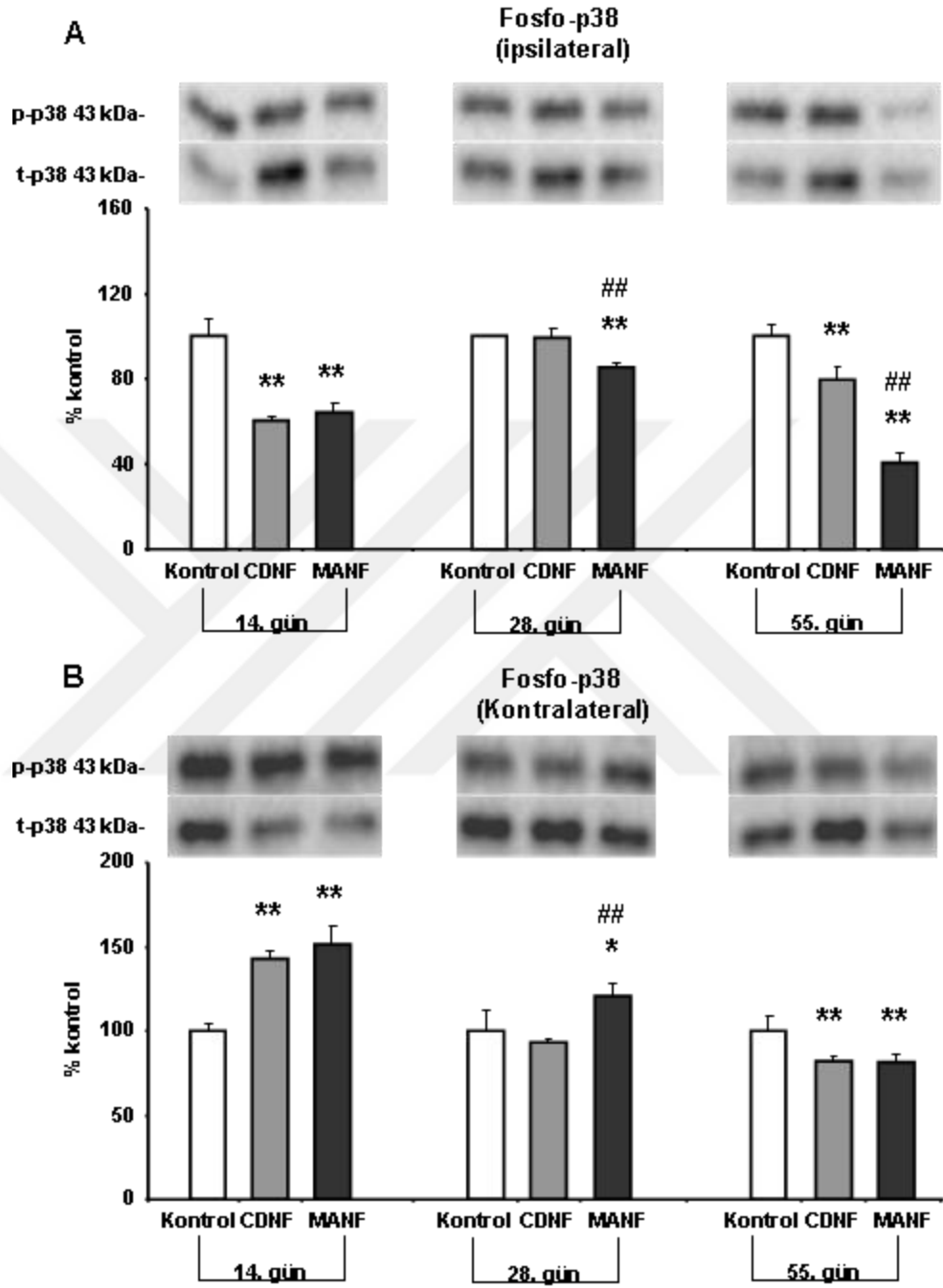
Şekil 6.7.2.1. İskemi sonrası CDNF ve MANSF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p44/-42 anlatımına etkisi

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-p44/-42 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde ise MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-p44/-42 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmış, 55. günde ise CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırırken, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 6.7.2.1., \*p<0,05, \*\*p<0,01, #p<0,05, ##p<0,01).



### 6.7.3. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p38 anlatımına etkisi



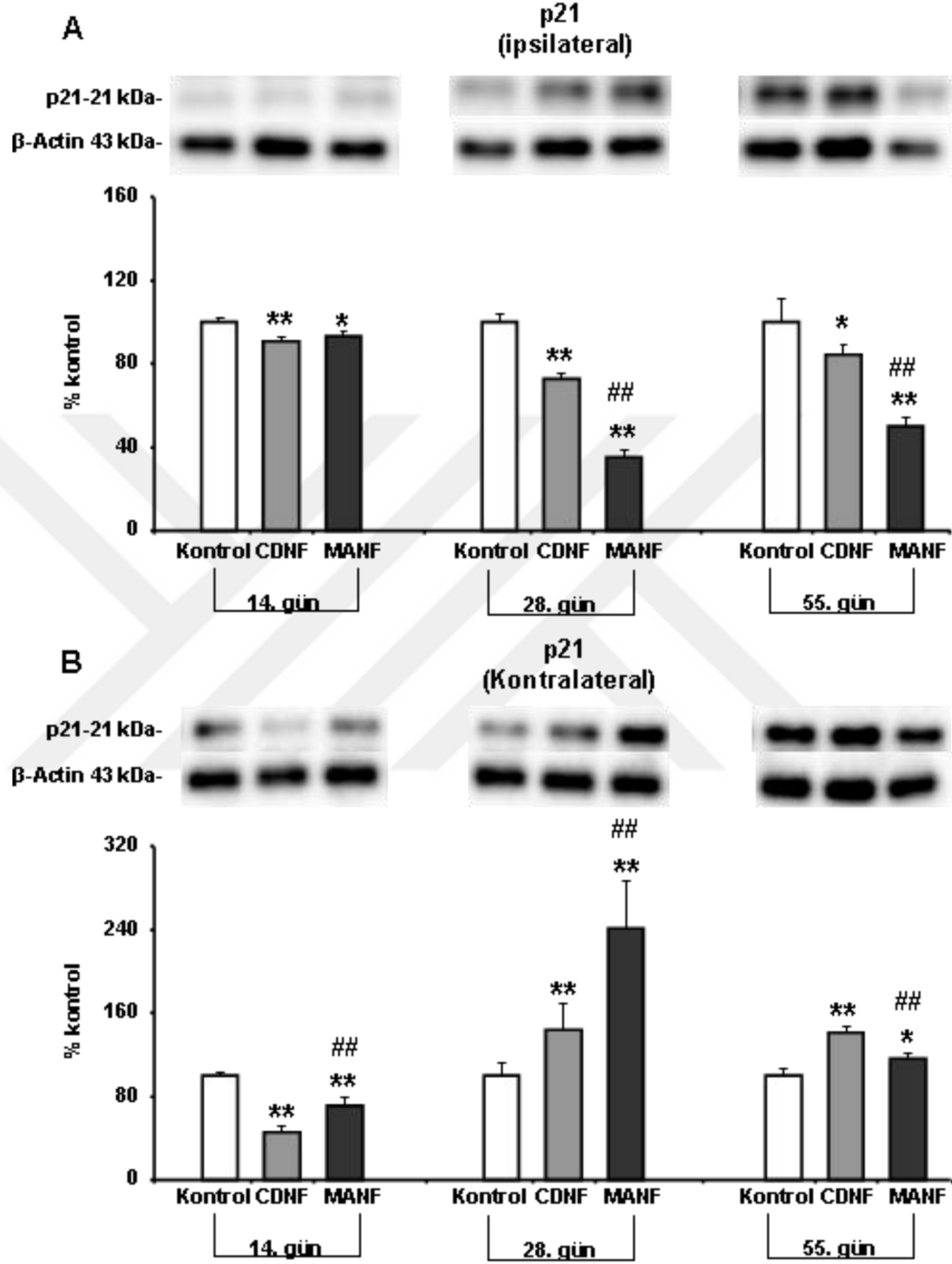
Şekil 6.7.3.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p38 anlatımına etkisi

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-p38 seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi, 28. günde sadece MANF tedavisi, 55. günde ise hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-p38 seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi, 28. günde sadece MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde ise hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.7.3.1., \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ## $p < 0,01$ ).



#### 6.7.4. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak p21 anlatımına etkisi



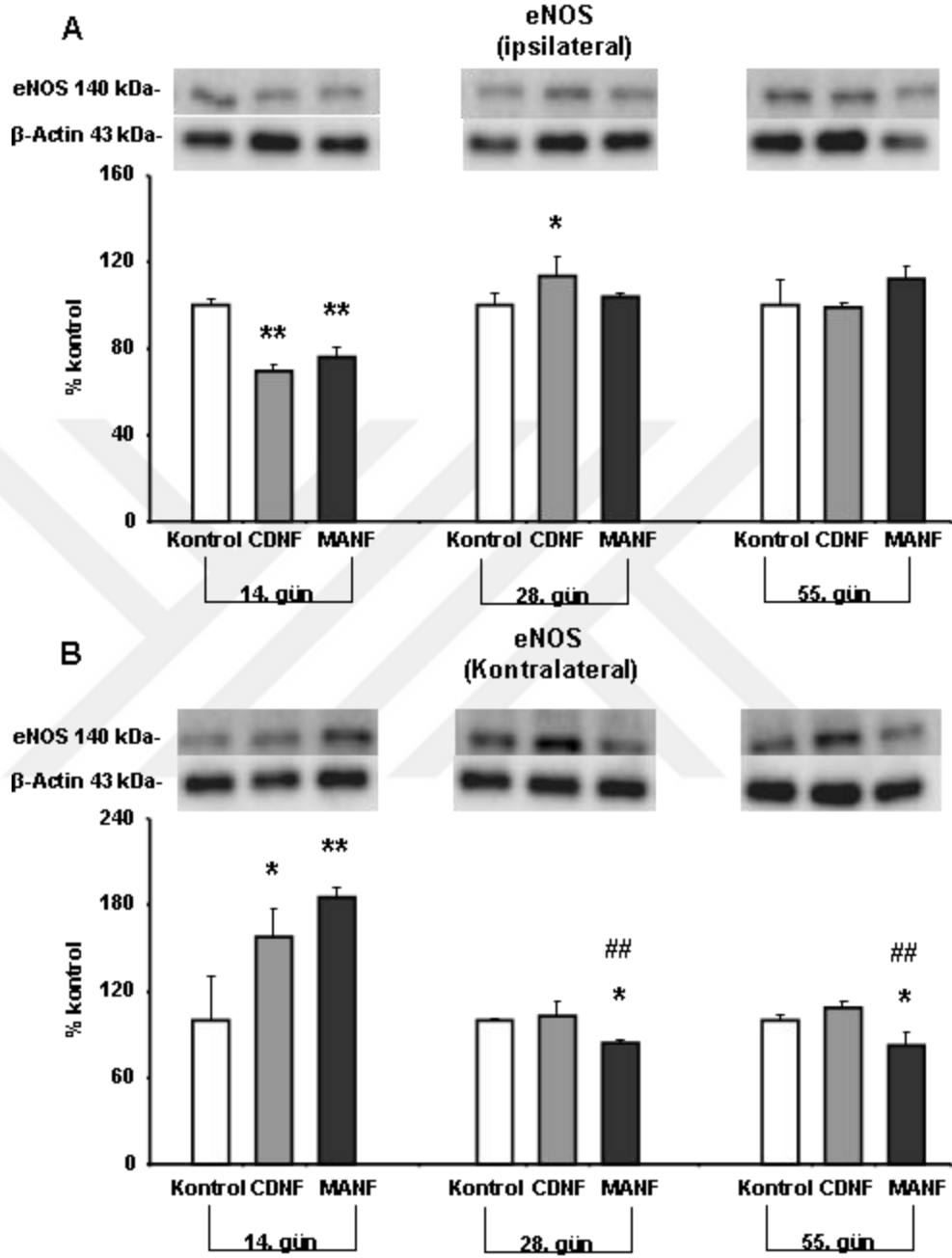
Şekil 6.7.4.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak p21 anlatımına etkisi

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda p21 seviyesini 14. günde, 28. günde ve 55. günlerde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral

striatumda p21 seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde ve 55. günlerde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 6.7.4.1., \*p<0,05, \*\*p<0,01, ##p<0,01).



### 6.7.5. İskemi sonrası CDNF ve MАНF tedavisinin zamana bağı olarak eNOS anlatımına etkisi



Şekil 6.7.5.1. İskemi sonrası CDNF ve MАНF tedavisinin zamana bağı olarak eNOS anlatımına etkisi

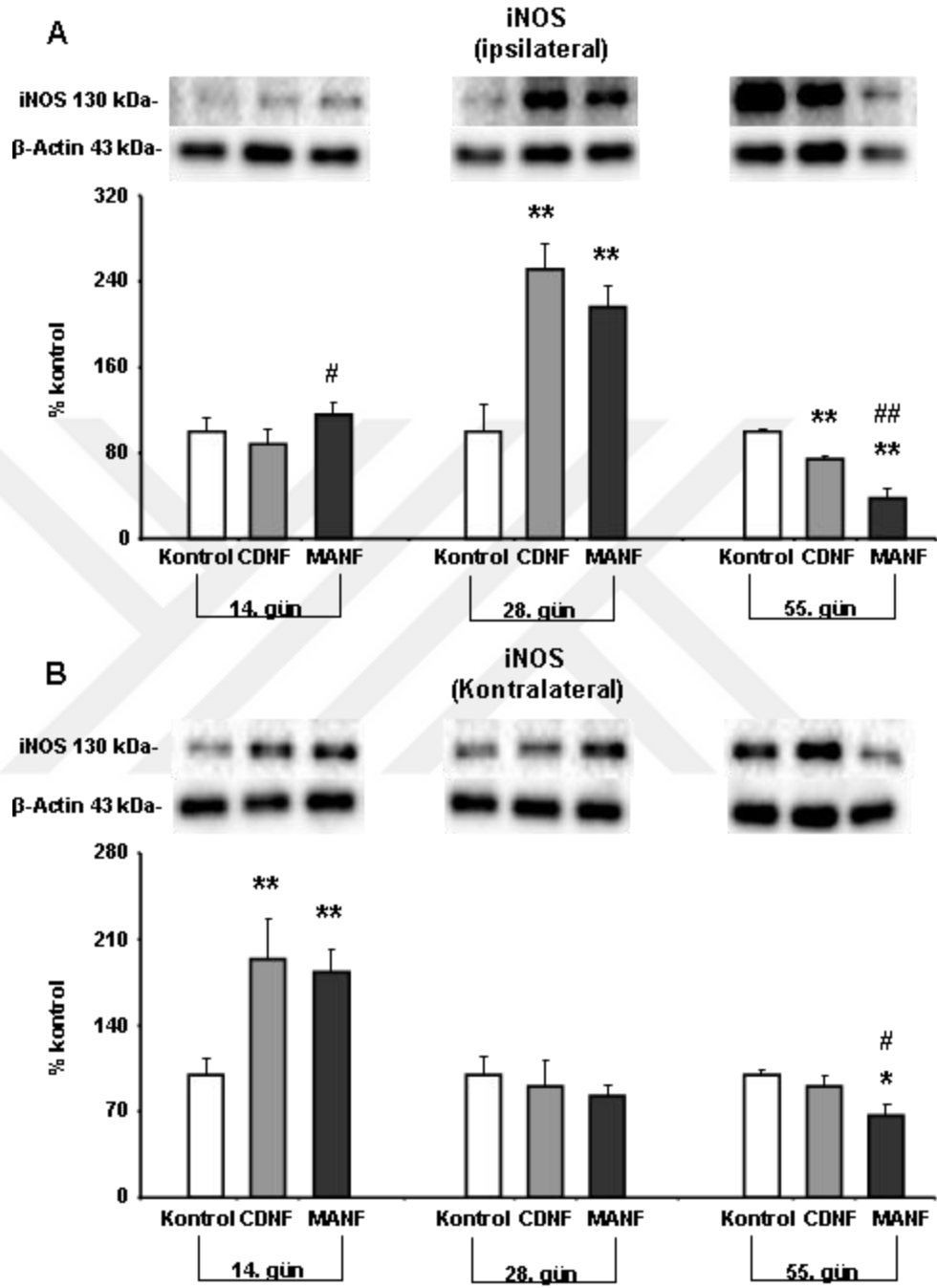


Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda eNOS seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde CDFN tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda eNOS seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde ve 55. günlerde ise MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.7.5.1., \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ## $p < 0,01$ ).



### 6.7.6. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak iNOS anlatımına etkisi



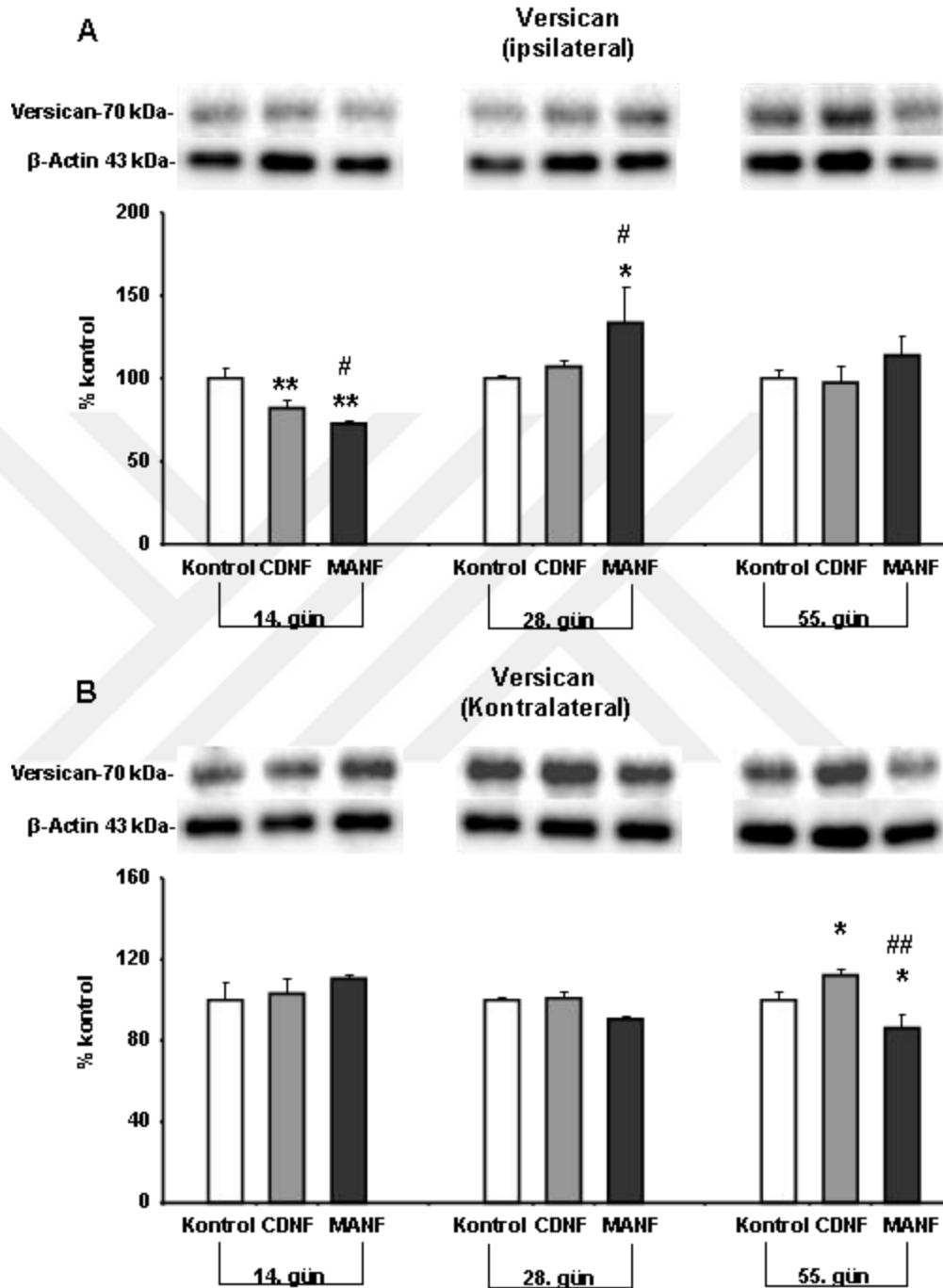
Şekil 6.7.6.1 İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak iNOS anlatımına etkisi

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda iNOS seviyesini 14. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda iNOS seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.7.6.1., \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ).



### 6.7.7. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Versican anlatımına etkisi



Şekil 6.7.7.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Versican anlatımına etkisi

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda versican seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda versican seviyesini 14. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, MANF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 6.7.7.1., \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ).

## **6.8 İskemi sonrası gen ekspresyon değişiklikleri**

Gen ekspresyon çalışmaları için, fareler iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların beyinlerinden bregmadan 2 mm kaudal ve 2 mm rostral bloklar halinde kesitler kurubuz üzerinde alınmıştır. Bu bloklardan hasara ipsilateral ve kontralateral olacak şekilde striatum ve motor korteks olmak üzere 4 bölgeden örnekler toplanmış ve gen ekspresyonundaki değişiklikler incelenmiştir.

Anti-inflammatuar etkili genler ( $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ ), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9), plastisiteyi uyarıcı ve hücre yaşamını etkileyen genler (GAP43, CNTF, BDNF, CDNF, MANF) ve plastisiteyi engelleyen genler (Ncam1, Ephrin A5, Ephrin B1, Versican, Ncan, Ntn1) olmak üzere toplam 17 gen ile ilgili değişiklikler incelenmiştir.

### 6.8.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 $\beta$ )

**Tablo 6.8.1.1** İpsilateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi

İnterlökin-1 Beta (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,10±0,03*	0,05±0,00*	0,75±0,11	1,34±0,16	0,13±0,03*	0,32±0,03*
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,09±0,00*	0,06±0,01*	0,76±0,15	0,83±0,24	0,14±0,02*	0,36±0,08*

**Tablo 6.8.1.2** Kontralateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi

İnterlökin-1 Beta (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,41±0,08*	1,11±0,22	1,00±0,43	0,76±0,45	0,15±0,05*	0,40±0,15*
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,33±0,39	0,66±0,32	1,40±0,75	1,17±0,94	0,15±0,06	0,52±0,04

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem 14. günde hem de 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,10±0,03 kat ve 0,05±0,00 kat, 55. günde 0,13±0,02 kat ve 0,32±0,03 kat azaltmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste hem 14. günde hem de 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,09±0,00 kat ve 0,06±0,01 kat, 55. günde 0,14±0,02 kat ve 0,36±0,08 kat azaltmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 14. günde sadece CDNF tedavisi interlökin-1beta seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olarak 1,41±0,08 kat arttırırken, 55. günde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,15±0,05 kat ve 0,40±0,15 kat azaltmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı

olmasa da sırasıyla  $0,15\pm0,06$  kat ve  $0,52\pm0,04$  kat azaltmıştır (Tablo 6.8.1.1. ve 6.8.1.2.).

### 6.8.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (*TNF $\alpha$* )

**Tablo 6.8.2.1** İpsilateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi

TNF- $\alpha$ (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,30±0,13*	0,48±0,03*	1,43±0,76	1,17±0,65	0,14±0,02*	0,58±0,21
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,24±0,04*	0,33±0,10*	1,91±0,21*	1,93±0,97	0,14±0,05*	0,76±0,19

**Tablo 6.8.2.2** Kontralateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi

TNF- $\alpha$ (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,54±0,25	0,83±0,24	0,18±0,06*	0,61±0,18	0,13±0,12	0,42±0,12*
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,13±0,12	0,19±0,04*	0,47±0,26	0,79±0,46	0,09±0,09	0,39±0,22

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 14. günde CDNF veya MANF tedavileri 55. günde ise sadece CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde  $0,30\pm0,13$  kat ve  $0,48\pm0,03$  kat, 55. günde  $0,14\pm0,02$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi 55. günde sadece CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde  $0,24\pm0,04$  kat ve  $0,33\pm0,10$  kat, 55. günde  $0,14\pm0,05$  kat azaltmış, 28. günde ise sadece CDNF tedavisi TNF-alfa seviyesini istatistiksek olarak anlamlı ölçüde  $1,91\pm0,21$  kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 28. günde CDNF tedavisi, 55. günde ise MANF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak

anlamli ölçüde sırasıyla  $0,18\pm 0,06$  kat ve  $0,42\pm 0,12$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde MANF tedavisi, TNF- Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamli ölçüde  $0,19\pm 0,04$  kat azaltmıştır. (Tablo 6.8.2.1. ve 6.8.2.2.,  $p<0,05$ )

### 6.8.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (*TGF $\beta$* )

**Tablo 6.8.3.1** İpsilateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi

TGF- $\beta$ 1 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,46 $\pm$ 0,46	1,38 $\pm$ 0,51	0,89 $\pm$ 0,20	1,74 $\pm$ 0,12*	0,38 $\pm$ 0,03*	1,18 $\pm$ 0,09
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,04 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,20	0,67 $\pm$ 0,05*	0,35 $\pm$ 0,01*	1,39 $\pm$ 0,11

**Tablo 6.8.3.2** Kontralateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi

TGF- $\beta$ 1 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,20 $\pm$ 0,10	1,34 $\pm$ 0,27	0,87 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,05*	0,61 $\pm$ 0,07
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,31 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,13	0,58 $\pm$ 0,18	0,76 $\pm$ 0,26

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamli ölçüde  $1,74\pm 0,12$  kat arttırırken, 55. günde CDFN tedavisi istatistiksel olarak anlamli ölçüde  $0,38\pm 0,03$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi, 55. günde ise CDFN tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamli ölçüde sırasıyla  $0,67\pm 0,05$  kat ve  $0,35\pm 0,01$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde CDFN tedavisi TGF-Beta1'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamli ölçüde  $0,44\pm 0,05$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi



kontrollüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi TGF-Beta'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $0,58\pm0,18$  kat ve  $0,76\pm0,26$  kat azaltmıştır (Tablo 6.8.3.1. ve 6.8.3.2.).

#### 6.8.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF-A)

**Tablo 6.8.4.1** İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi

VEGF-A (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,14±0,14	0,76±0,50	1,19±0,04	1,67±0,01*	1,14±0,09	1,10±0,08
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,15±0,21	1,06±0,08	1,04±0,10	1,28±0,05	1,18±0,02	1,11±0,06

**Tablo 6.8.4.2** Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi

VEGF-A (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,36±0,71	1,64±0,33	0,89±0,07	1,00±0,10	1,01±0,03	1,05±0,09
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,40±0,08	1,30±0,02	0,81±0,11	1,32±0,03	1,01±0,06	0,97±0,03

Kendi kontrollüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $1,67\pm0,01$  kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrollüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $1,18\pm0,02$  kat ve  $1,11\pm0,06$  kat arttırmıştır. Kendi kontrollüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $1,01\pm0,03$  kat ve  $1,05\pm0,09$  kat arttırmıştır. Kendi kontrollüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı

olmadan  $1,01\pm 0,06$  kat arttırsa da MANF tedavisi  $0,97\pm 0,03$  kat azaltmıştır (Tablo 6.8.4.1. ve 6.8.4.2.).

### 6.8.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF-B)

**Tablo 6.8.5.1** İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi

VEGF-B (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
Striatum	$1,06\pm 0,07$	$0,99\pm 0,05$	$1,17\pm 0,12$	$2,09\pm 0,13^*$	$1,18\pm 0,09$	$1,11\pm 0,10$
Korteks	$1,15\pm 0,05$	$1,23\pm 0,09$	$0,93\pm 0,07$	$1,27\pm 0,08$	$1,16\pm 0,14$	$1,09\pm 0,06$

**Tablo 6.8.5.2** Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi

VEGF-B (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
Striatum	$1,26\pm 0,04$	$1,48\pm 0,08^*$	$0,87\pm 0,12$	$1,02\pm 0,07$	$1,13\pm 0,18$	$1,00\pm 0,02$
Korteks	$1,29\pm 0,03$	$1,35\pm 0,07$	$0,81\pm 0,03$	$1,26\pm 0,07$	$1,21\pm 0,14$	$1,05\pm 0,14$

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $2,09\pm 0,13$  kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $1,16\pm 0,14$  kat ve  $1,09\pm 0,06$  kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 14. günde MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $1,48\pm 0,08$  kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $1,21\pm 0,14$  kat ve  $1,05\pm 0,14$  kat arttırmıştır (Tablo 6.8.5.1. ve 6.8.5.2.).

### 6.8.6. Matriks Metallopeptidaz 9 (MMP-9)

**Tablo 6.8.6.1** İpsilateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi

MMP-9 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,57±0,05	0,49±0,09	1,14±0,06	1,87±0,31*	1,19±0,28	1,44±0,04*
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,20±0,01	0,90±0,67	1,16±0,18	1,23±0,24	0,90±0,25	1,11±0,23

**Tablo 6.8.6.2** Kontralateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi

MMP-9 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,69±0,13	1,20±0,34	1,02±0,29	1,25±0,48	1,12±0,50	1,82±0,98
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,88±0,41	0,91±0,38	1,25±0,36	2,80±1,20	1,23±0,42	1,97±0,39*

Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem 28. g¼nde hem de 55. g¼nde MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölç¼de sırasıyla 1,87±0,31 kat ve 1,44±0,04 kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. g¼nde CDNF tedavisi MMP9'un seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,90±0,25 kat azaltırken MANF tedavisi ise 1,11±0,23 kat arttırmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. g¼nde hem CDNF hem de MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,12±0,50 kat ve 1,82±0,98 kat arttırmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. g¼nde MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölç¼de 1,97±0,39 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.6.1. ve 6.8.6.2.,  $p<0,05$ )

### 6.8.7. Büyüme ile İlgili Protein 43 (GAP43)

**Tablo 6.8.7.1** İpsilateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi

GAP43 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,07±0,18	0,68±0,11	1,31±0,18	2,27±0,26*	1,50±0,40	1,18±0,36
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,02±0,20	0,64±0,10	1,11±0,03	1,64±0,05*	1,43±0,12	1,22±0,09

**Tablo 6.8.7.2** Kontralateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi

GAP43 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,79±0,10	0,71±0,01	0,82±0,07	1,48±0,23	1,49±0,03*	1,33±0,04
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,81±0,02	0,75±0,08	0,68±0,04	1,12±0,02	1,49±0,02*	1,11±0,07

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,27±0,26 kat arttırmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,64±0,05 kat arttırmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde CDNF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,49±0,03 kat arttırmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,49±0,02 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.7.1. ve 6.8.7.2., p<0,05)

### 6.8.8. Siliyer Nörotrofik Faktör (SNF, CNTF)

**Tablo 6.8.8.1** İpsilateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi

CNTF (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,05±0,11	1,22±0,10	1,20±0,29	1,10±0,15	0,38±0,01	0,77±0,07
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,04±0,03	1,38±0,18	1,09±0,13	0,87±0,07	0,39±0,02*	0,81±0,05

**Tablo 6.8.8.2** Kontralateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi

CNTF (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,41±0,27	1,14±0,19	1,81±0,06	2,00±0,37*	0,52±0,15	0,73±0,06
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,18±0,11	1,04±0,10	1,92±0,15*	1,81±0,57	0,47±0,15	0,74±0,15

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla  $0,38\pm 0,01$  kat ve  $0,77\pm 0,07$  kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $0,39\pm 0,02$  kat azaltmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 28. günde MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $2,00\pm 0,37$  kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 28. günde CDNF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde  $1,92\pm 0,15$  kat arttırmıştır (Tablo 6.8.8.1. ve 6.8.8.2.,  $p<0,05$ )

### 6.8.9. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BKNF, *BDNF*)

**Tablo 6.8.9.1** İpsilateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi

<b>BDNF (Kat değişimi)</b>						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,29±0,25	1,87±0,37	0,83±0,05	0,74±0,07	1,15±0,01	1,09±0,05
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,23±0,08	2,04±0,19*	0,66±0,04	0,58±0,03	1,04±0,25	1,19±0,34

**Tablo 6.8.9.2** Kontralateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi

<b>BDNF (Kat değişimi)</b>						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	3,14±0,17*	4,38±0,52*	2,54±0,31*	2,51±0,34*	1,01±0,11	0,91±0,05
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	2,62±0,27*	4,41±0,57*	2,44±0,22*	2,38±0,23*	1,13±0,26	0,89±0,13

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,15±0,01 kat ve 1,09±0,05 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,04±0,25 kat ve 1,19±0,34 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 14. günde ve 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 3,14±0,17 kat ve 4,38±0,52 kat, 28. günde 2,54±0,31 kat ve 2,51±0,34 kat arttırmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde ve 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 2,62±0,27 kat ve 4,41±0,57 kat, 28. günde 2,44±0,22 kat ve 2,38±0,23 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.9.1. ve 6.8.9.2., p<0,05)

### 6.8.10. Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (SDNF, *CDNF*)

**Tablo 6.8.10.1** İpsilateral striatum ve kortekste *CDNF*'nin gen seviyesindeki analizi

<b>CDNF (Kat değişimi)</b>						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,92±1,61	1,81±1,91	1,44±0,52	1,46±0,33	1,10±0,34	0,94±0,26
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,06±0,15	1,21±0,45	0,81±0,17	0,87±0,06	1,07±0,12	0,77±0,09

**Tablo 6.8.10.2** Kontralateral striatum ve kortekste *CDNF*'nin gen seviyesindeki analizi

<b>CDNF (Kat değişimi)</b>						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,13±0,33	1,40±0,25	0,64±0,18	0,89±0,31	1,03±0,83	0,81±0,46
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,81±0,17	1,22±0,13	0,73±0,16	0,96±0,38	0,87±0,26	0,81±0,23

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde *CDNF* tedavisi *CDNF*'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,10±0,34 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,94±0,26 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde *CDNF* tedavisi *CDNF*'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,07±0,12 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,77±0,09 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde *CDNF* tedavisi *CDNF*'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,03±0,83 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,81±0,46 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem *CDNF* tedavisi hem de MANF tedavisi *CDNF*'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,87±0,26 kat ve 0,81±0,23 kat azaltmıştır (Tablo 6.8.10.1. ve 6.8.10.2.).

### 6.8.11. Mezensefalik Astrosit-türevli Nörotrofik Faktör (MANF)

**Tablo 6.8.11.1** İpsilateral striatum ve kortekste MANF'n gen seviyesindeki analizi

MANF (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,10±0,01	1,07±0,01	0,95±0,14	1,01±0,17	0,67±0,03	0,69±0,11
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,95±0,08	0,92±0,02	0,81±0,06	1,16±0,04	0,69±0,04	0,76±0,07

**Tablo 6.8.11.2** Kontralateral striatum ve kortekste MANF'n gen seviyesindeki analizi

MANF (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,93±0,26*	1,61±0,15	1,17±0,10	0,96±0,11	0,85±0,10	0,84±0,09
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,70±0,44	1,51±0,18	0,92±0,10	1,03±0,06	0,99±0,11	0,82±0,05

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'n seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,67±0,03 kat ve 0,69±0,11 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'n seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,69±0,04 kat ve 0,76±0,07 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 14. günde CDNF tedavisi MANF'n seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,93±0,26 kat arttırırken, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'n seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,85±0,10 kat ve 0,84±0,09 kat arttırmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'n seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,99±0,11 kat ve 0,82±0,05 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.11.1. ve 6.8.11.2.).



### 6.8.12. Nöronal Hücresel Adhezyon Molekülü 1 (*Ncam1*)

**Tablo 6.8.12.1** İpsilateral striatum ve kortekste *Ncam1*'in gen seviyesindeki analizi

<b>Ncam1 (Kat değişimi)</b>						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,13±0,06	0,69±0,03	1,32±0,11	2,10±0,35*	1,31±0,01	1,39±0,06
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,16±0,15	0,72±0,10	1,20±0,14	2,67±0,08*	1,30±0,07	1,43±0,07

**Tablo 6.8.12.2** Kontralateral striatum ve kortekste *Ncam1*'in gen seviyesindeki analizi

<b>Ncam1 (Kat değişimi)</b>						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,96±0,03	0,79±0,02	0,83±0,04	1,04±0,02	1,58±0,23	1,38±0,29
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,90±0,11	0,82±0,10	0,71±0,03	1,16±0,09	1,61±0,07*	1,32±0,05

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi *Ncam1*'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,10±0,35 kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi *Ncam1*'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,67±0,08 kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi *Ncam1*'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,58±0,23 kat ve 1,38±0,29 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDFN tedavisi *Ncam1*'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,61±0,07 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.12.1. ve 6.8.12.2.,  $p<0,05$ ).

### 6.8.13. Efrin A5

**Tablo 6.8.13.1** İpsilateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi

Efrin A5 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,62±0,20	1,42±0,14	1,12±0,09	1,13±0,04	1,16±0,07	1,08±0,12
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,78±0,24*	1,31±0,08	0,99±0,02	1,21±0,07	1,17±0,11	1,15±0,15

**Tablo 6.8.13.2** Kontralateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi

Efrin A5 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,53±0,11	1,45±0,16	1,37±0,04	1,54±0,13	0,71±0,08	0,85±0,09
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,36±0,08	1,16±0,06	1,30±0,09	1,74±0,06*	0,76±0,13	0,93±0,15

Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. g¼nde hem CDFN hem de MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,16±0,07 kat ve 1,08±0,12 kat arttırmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 14. g¼nde CDFN tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölç¼de 1,78±0,24 arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. g¼nde hem CDFN hem de MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,71±0,08 kat ve 0,85±0,09 kat azaltmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral kortekste 28. g¼nde MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölç¼de 1,74±0,06 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.13.1. ve 6.8.13.2.,  $p<0,05$ ).

#### 6.8.14. Efrin B1

**Tablo 6.8.14.1** İpsilateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi

Efrin B1 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,28±0,19	1,13±0,11	1,07±0,19	1,11±0,10	1,07±0,26	0,90±0,25
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,27±0,17	1,29±0,10	0,95±0,14	1,12±0,08	1,22±0,17	1,01±0,23

**Tablo 6.8.14.2** Kontralateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi

Efrin B1 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. g¼n		28. g¼n		55. g¼n	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,64±0,20	1,32±0,02	0,80±0,07	0,88±0,07	1,18±0,22	1,01±0,28
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,38±0,15	1,15±0,11	0,77±0,10	0,87±0,06	1,14±0,16	0,83±0,18

Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. g¼nde CDNF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,07±0,26 kat arttırırken, MANF tedavisi ise 0,90±0,25 kat azaltmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. g¼nde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,22±0,17 kat ve 1,01±0,23 kat arttırmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. g¼nde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,18±0,22 kat ve 1,01±0,28 kat arttırmıştır. Kendi kontrol¼yle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. g¼nde CDNF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen d¼zeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,14±0,16 kat arttırırken, MANF tedavisi ise 0,83±0,18 kat azaltmıştır (Tablo 6.8.14.1. ve 6.8.14.2.).

### 6.8.15. Versican

**Tablo 6.8.15.1** İpsilateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi

Versican (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,44±0,27	1,63±0,34	1,13±0,15	1,82±0,17*	1,02±0,05	1,05±0,11
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,25±0,19	1,31±0,37	1,03±0,08	1,17±0,12	1,06±0,19	1,24±0,16

**Tablo 6.8.15.2** Kontralateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi

Versican (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,68±0,11	1,30±0,30	0,53±0,07	0,58±0,04	0,75±0,13	0,67±0,13
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,62±0,08*	1,18±0,15	0,56±0,02*	0,74±0,05	0,56±0,05	0,69±0,11

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 28. günde MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,82±0,17 kat arttırmıştır. ( $p<0,05$ ) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,06±0,19 kat ve 1,24±0,16 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,75±0,13 kat ve 0,67±0,13 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde CDNF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,62±0,08 kat arttırırken, 28. günde CDNF tedavisi 0,56±0,02 kat azaltmıştır (Tablo 6.8.15.1. ve 6.8.15.2.,  $p<0,05$ )

## 6.8.16. Nörocan

**Tablo 6.8.16.1** İpsilateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi

Nörocan (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,72±0,19*	1,62±0,25	1,41±0,61	1,21±0,48	1,38±0,29	1,51±0,28
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,15±0,42	1,21±0,55	1,08±0,04	1,02±0,09	1,20±0,10	1,12±0,13

**Tablo 6.8.16.2** Kontralateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi

Nörocan (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,94±0,47	1,92±0,48	1,00±0,15	0,90±0,13	1,12±0,03	0,96±0,22
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	1,81±0,09*	1,51±0,09	0,56±0,02	0,98±0,13	1,32±0,07	0,90±0,06

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,38±0,29 kat ve 1,51±0,28 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,20±0,10 kat ve 1,12±0,13 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 55. günde CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,12±0,03 kat arttırırken, MANF tedavisi 0,96±0,22 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,81±0,09 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.16.1. ve 6.8.16.2., p<0,05).

## 6.8.17. Netrin-1

**Tablo 6.8.17.1** İpsilateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi

Netrin-1 (Kat değişimi)						
İpsilateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,95±0,02	0,76±0,02	1,12±0,02	1,51±0,06	0,89±0,16	0,95±0,14
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,94±0,31	0,80±0,18	0,99±0,18	1,34±0,15	0,93±0,09	1,04±0,08

**Tablo 6.8.17.2** Kontralateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi

Netrin-1 (Kat değişimi)						
Kontralateral	14. gün		28. gün		55. gün	
Striatum	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,86±0,17	0,79±0,11	0,76±0,11	0,68±0,03	2,41±0,25*	1,48±0,13
Korteks	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
	0,83±0,09	0,70±0,10	0,58±0,03	0,88±0,07	2,07±0,12*	1,69±0,08*

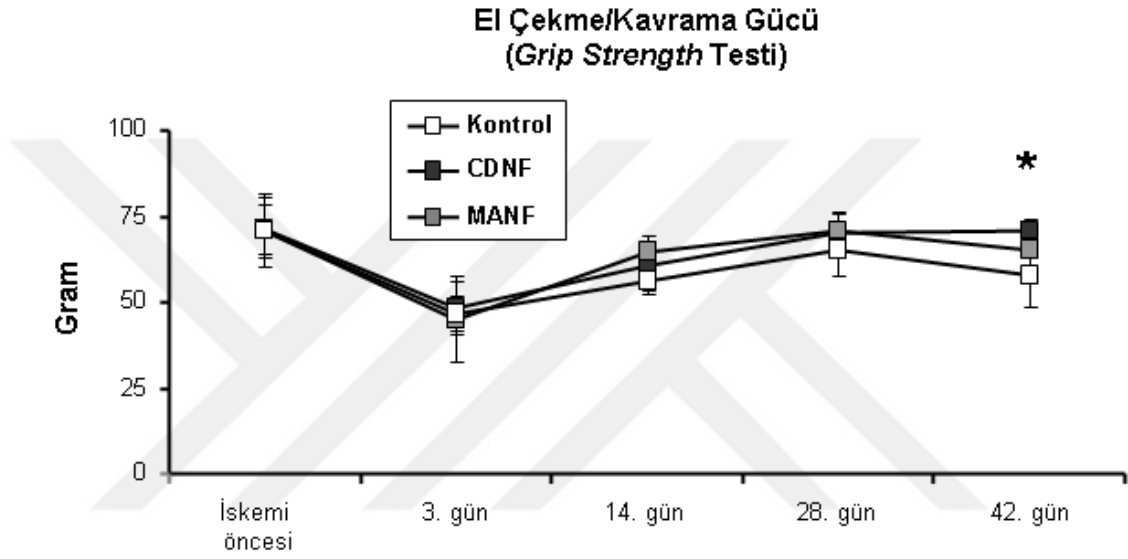
Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocacın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,89±0,16 kat ve 0,95±0,14 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi Nörocacın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,93±0,09 kat azalırken, MANF tedavisi 1,04±0,08 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 55. günde CDNF tedavisi Ntn1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,41±0,25 kat, MANF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,48±0,13 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Ntn1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 2,07±0,12 kat ve 1,69±0,08 kat arttırmıştır (Tablo 6.8.17.1. ve 6.8.17.2.). Kontrol grubuyla kıyaslandığında kırmızı renk azalışı, yeşil renk artışı, sarı renk ise değişimin olmadığını ifade etmektedir.

## 6.9. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili davranış testleri

### 6.9.1. İskemi sonrası davranış testlerinin değerlendirilmesi

Fonksiyonel nörolojik iyileşme operasyondan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan davranış testleri ile değerlendirilmiştir. İlk davranış testleri beyin felcinden önce taban çizgi (*baseline*) oluşturmak amacıyla yapılmıştır.

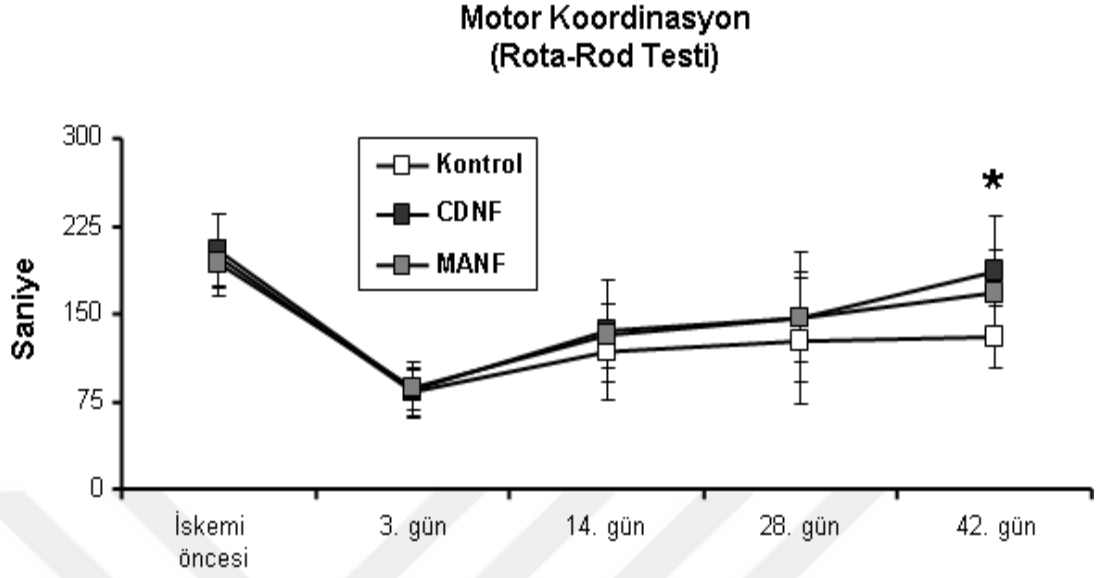
### 6.9.2. El çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi



**Şekil 6.9.2.1.** İskemi sonrası el çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi

Farelerin beyin felci sonrasındaki çekme/kavrama gücündeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla el çekme gücü testi yapılmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 6.9.2.1.,  $F(2,15)=20,756$   $p<0,01$ , 42. günde  $p=0,14$ ).

### 6.9.3. RotaRot ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi

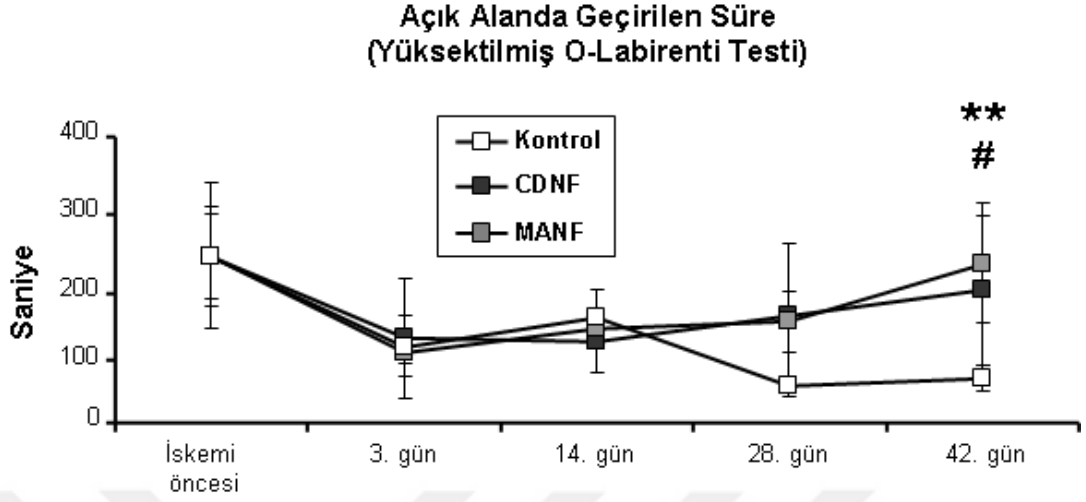


**Şekil 6.9.3.1.** İskemi sonrası motor koordinasyonun değerlendirilmesi

Farelerin beyin felci sonrasındaki motor koordinasyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi amacıyla rotarod testi yapılmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrole grubuna göre CDNF tedavisi motor koordinasyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmıştır (Şekil 6.9.3.1.,  $F(2,14)=1,111$   $p=0,357$ , 42. günde  $p=0,012$ ).



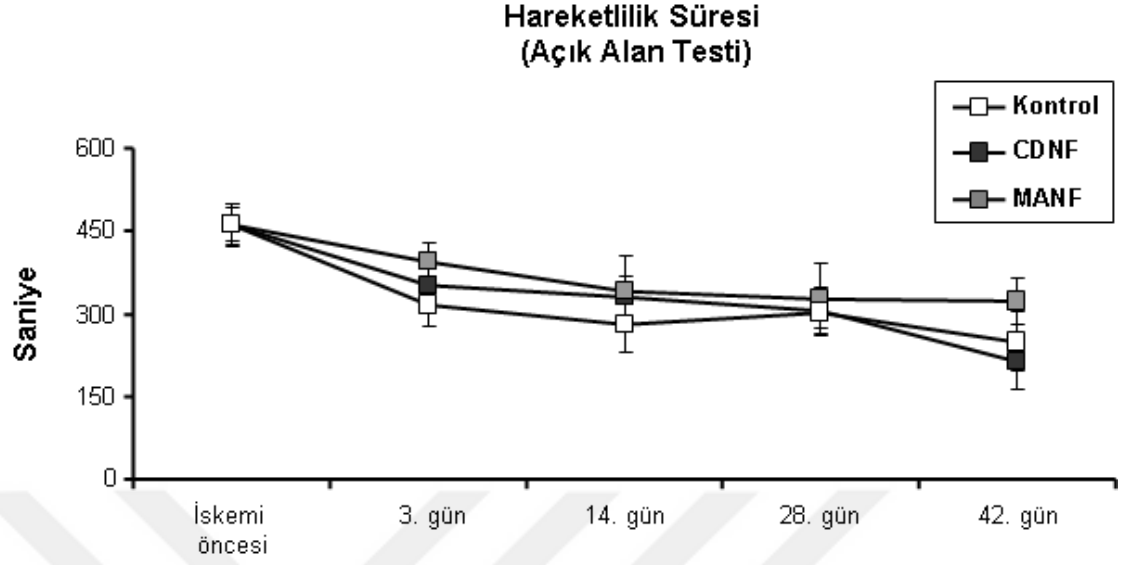
#### 6.9.4. Yükseltilmiş O-labirenti ile anksiyetenin değerlendirilmesi



**Şekil 6.9.4.1.** İskemi sonrası anksiyetenin değerlendirilmesi

İskemi sonrası motor davranışı ve anksiyeteyi ölçmek için yükseltilmiş o-labirenti testi yapılmıştır. Bu teste farelerin açık alanda geçirdikleri süre hesaplanmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi endişe ve korkuyu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 6.9.4.1.).

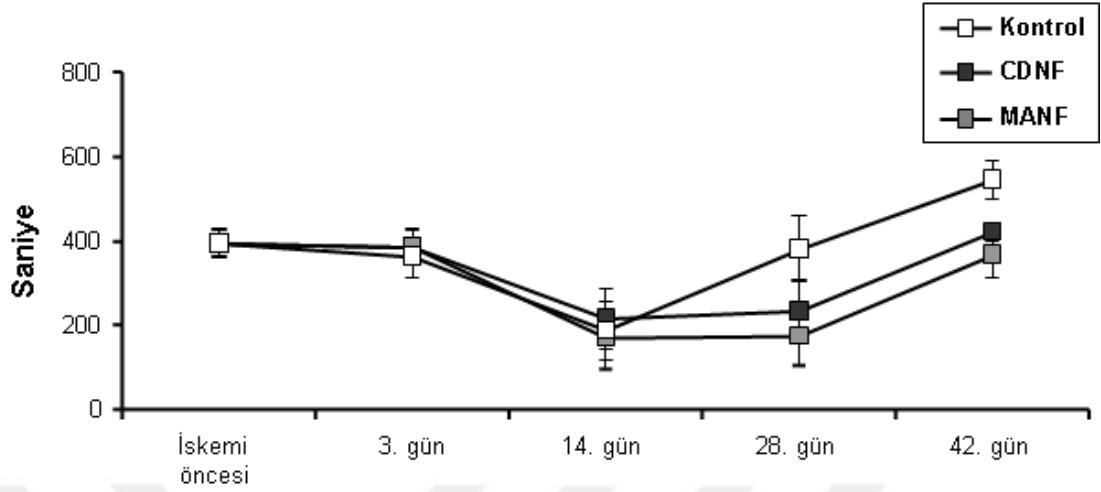
### 6.9.5. Açık alan testi ile motor aktivitelerin değerlendirilmesi



**Şekil 6.9.5.1.** İskemi sonrası hareketlilik süresinin değerlendirilmesi

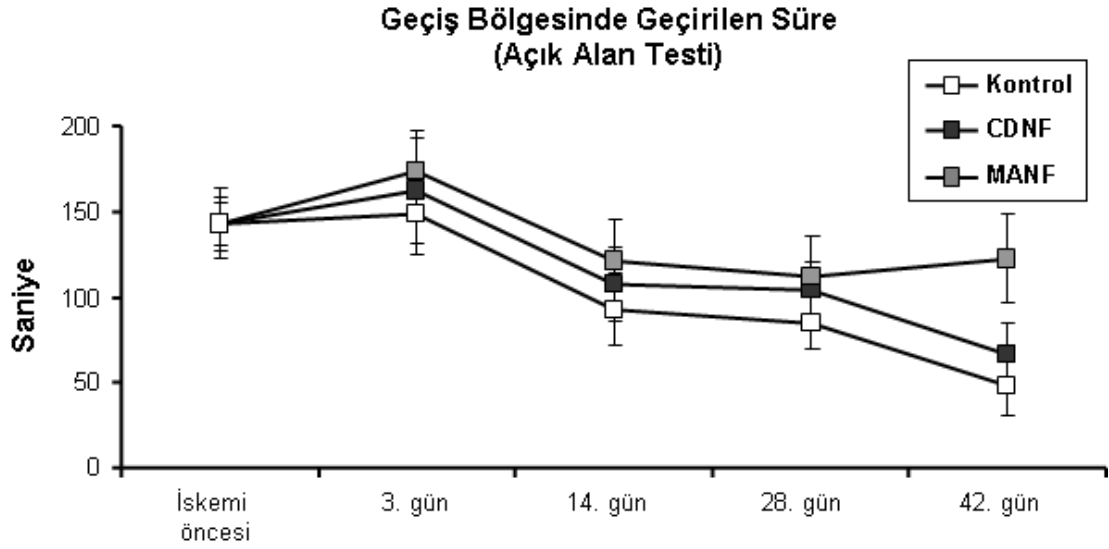
İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin hareketli kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre MANF tedavisinde hayvanların hareketli kaldıkları süre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmıştır (Şekil 6.9.5.1.).

### Kenar Bölgesinde Geçirilen Süre (Açık Alan Testi)



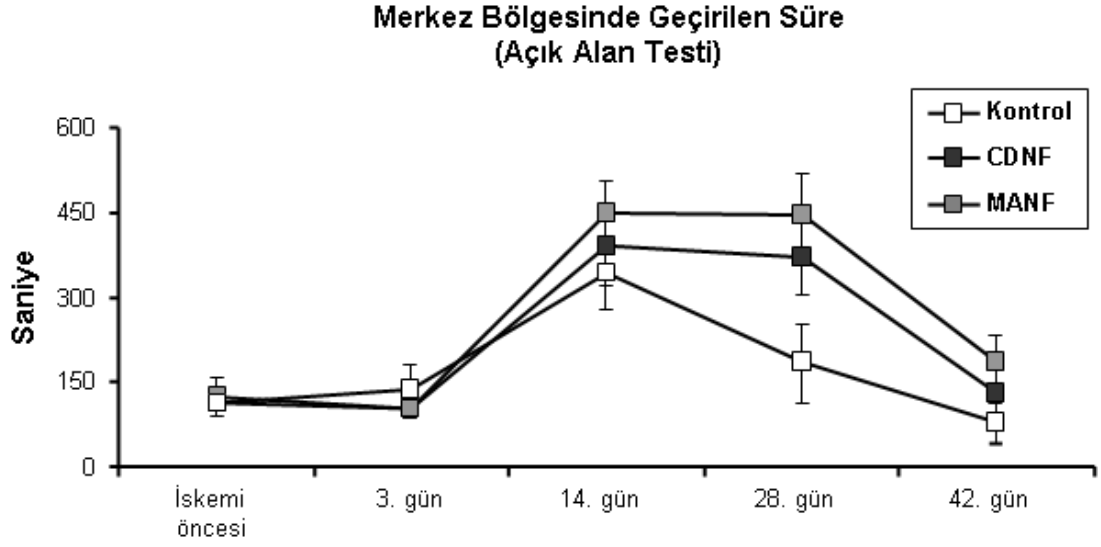
**Şekil 6.9.5.2.** İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; kenar bölgesi

İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (**kenar**, geçiş, merkez) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDF hem de MANF tedavisi hayvanların kenar bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştır (Şekil 6.9.5.2.).



**Şekil 6.9.5.3.** İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; geçiş bölgesi

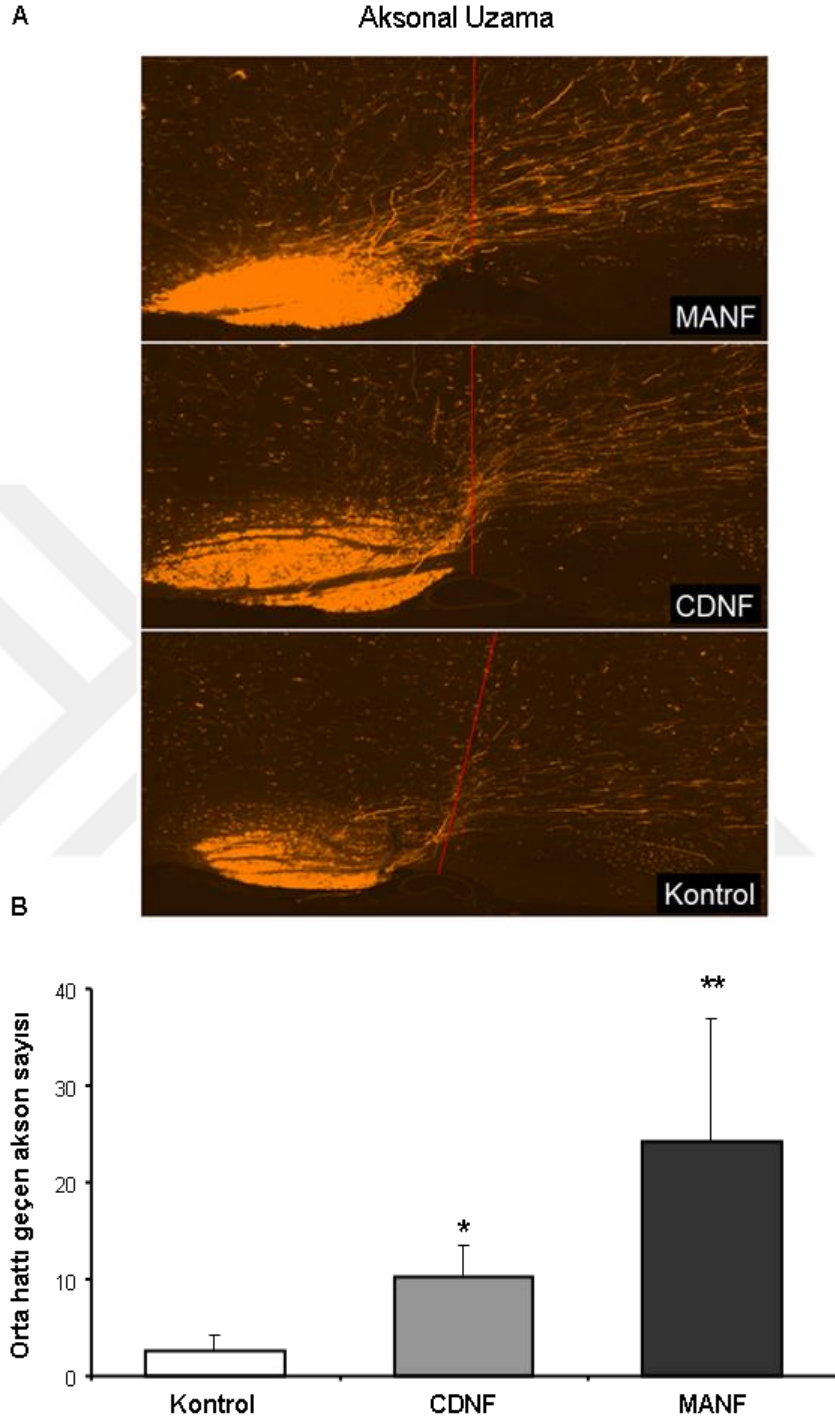
İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (kenar, **geçiş**, merkez) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDFN hem de MANF tedavisi hayvanların geçiş bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 6.9.5.3.).



**Şekil 6.9.5.4.** İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; merkez bölge

İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (kenar, geçiş, **merkez**) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 30. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF hem de MANF tedavisi hayvanların merkez bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 6.9.5.4.).

## 6.10. Aksonal uzamanın değerlendirilmesi



Şekil 6.10.1. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın değerlendirilmesi

İskemi sonrası kortikobulbar projeksiyonların değerlendirilmesi fasiyel nükleus seviyesinden yapılmıştır (Bregma -5,8 ile -6,3 mm arası). İki hemisfer arasındaki orta hatta çizilen 1000 µm'lik sanal çizgiyi (Şekil 6.10.1. kırmızı ile

gösterilen çizgi) geçen aksonların sayılması sonucu, aksonal uzamayı hem CDFN hem de MANF tedavisinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür (Şekil 6.10.1., CDFN  $p=0,021$ , MANF  $p=0,001$ ).

Tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol, CDFN veya MANF tedavi grupları arasındaki zamana bağlı değişimler tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve akabinde Fisher LSD post-hoc testi kullanılarak SPSS programında belirlenmiştir.  $p<0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

DNA kırıklarının belirlenmesi, atrofinin analizi, nörogenez, glial yaranın değerlendirilmesi, gen seviyesindeki analizler ve aksonal uzamanın değerlendirilmesinde “\*” kontrol grubuyla, protein seviyesindeki analizler ve davranış testlerinde “\*” kontrol, “#” ise CDFN grubuyla anlamlılığı ifade etmektedir (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , # $p<0,05$ , ## $p<0,01$ ).

## 7. TARTIŞMA

Bu tezde MANF ve CDNF nörotrofik faktörlerinin restoratif (onarıcı) etkilerinin hasar sonrası *in vivo* şartlarda i) nöronal hayatta kalım, ii) apoptotik hücre ölümü, iii) ölüme ve hayatta kalıma aracılık eden sinyal iletim yolları, iv) doku modellemesi, nörogenez, gliogenez v) piramidal trakt ve vi) fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaları çalışmak amacıyla insanlarda % 80 oranında inme vakalarından sorumlu olan OSA tıkanması fare modeli kullanılmıştır.

Kullanılan 30 dakika OSA tıkanması modeli, hayvanların striatularına yayılan bir hasar oluşturmaktadır ve bu hasar kortekse ulaşmamaktadır. Hasar oluşumu sonrasında MANF veya CDNF tedavilerinin hasara olan onarıcı etkisini görmek amacıyla apoptotik hücre hasarının tamamlandığı 72. saat beklenmiş ve maddeler hasarın tamamlandığı 72. saatte mini-ozmotik pompa kullanılarak verilmiştir. Hasarın zamana bağlı değişimini gen ve protein seviyesinde görebilmek için 14. gün, 28. gün ve 55. gün gibi farklı zaman noktalarında deneyler sonlandırılmış ve beyinlerden örnekler alınmıştır. Hasar üzerine olan etkisiyle birlikte fonksiyonel bir geri kazanım ilişkisi olup olmadığını görmek için, hasardan önce, hasarın tamamlandığı 3. günde ve iyileşme beklenen 14. gün, 28. gün ve 42. günde davranış deneyleri yapılmıştır. Son olarak yapılan tedavilerin plastisite üzerine etkisine bakabilmek için davranış deneylerinin bittiği 42. günde hücre gövdesinden aksona doğru taşınan *tracer* enjeksiyonu ile kontralateral korteksten ipsilateral fasiyel nükleusa olan projeksiyonlar değerlendirilmiştir.

Operasyonların tekrar edilebilirliğini ve iskeminin 30 dakika ile sınırlandırılmasının kontrolü için hayvanların beyin kan akımları LDF ile kontrol edilmiştir. Her ne kadar LDF ile kesin ve mutlak bir bölgesel kanlanma ölçümü yapılamasa da bu metotta non-invazif ve sürekli olarak beyindeki küçük bir bölgenin kan akımındaki anlık değişimler takip edilebilmektedir (177, 179). Yapılan tüm setlerde (14 gün, 28 gün, 55 gün ve davranış setleri) serebral kanlanma operasyon öncesine göre yaklaşık % 80'lik bir düşüş göstermiştir (Şekil 6.1.1.). 30 dakika iskemi sonrasında ise tüm gruplarda operasyon öncesi değere göre reperfüzyon aşamasında kan akımı tekrar yaklaşık % 100 seviyelerine çıkmıştır (Şekil 6.1.1.). Reperfüzyon



aşamasındaki kanlanma değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark görülmemiştir. Bu sonucu değerlendirirken tedavilerin 3. günde başladığı, reperfüzyon aşamasında gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmadığı göz önüne alınmalıdır. Kanlanmada herhangi bir değişiklik beklenmemekle birlikte tedavi aşamasına geldiğinde (3. günde) hayvanlarda hasarın oluşturulma şekli ile ilgili deneysel bir fark bulunmadığı düşünülmektedir. Böylece farklı günlerde yapılan hasarla ilgili yapılan analizlerde bulunan sonuçların tedavi kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

OSA tıkanmasına bağlı olarak striatumda yavaş ilerleyen sekonder hasar oluşmakta ve bunun sonucunda apoptotik hücre ölümü görülmektedir (177, 178). Apoptotik hücre ölümünü değerlendirebilmek için in situ hücre ölüm kiti kullanılmıştır. Apoptotik hücre ölümünün son aşaması olan DNA kırıklarının oluşmasını ölçen kit sayesinde apoptotik hücre sayısındaki zamana bağlı ve gruplar arasında değişiklikler incelenebilmiştir. Apoptotik hücre ölümünün en yüksek görüldüğü 3. günde tedaviye başlanmış olması sebebiyle 3. günde apoptotik hücre ölümüne dair herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır. Zamana ve hasarın etkisine bağlı olarak beklenen şekilde apoptotik hücre sayısı herhangi bir tedavinin olmadığı kontrol grubunda da düşmüştür (Şekil 6.2.1.). Özellikle 14. günde CDNF tedavisi ve 28. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürmüştür. 55. günde ise gruplar arasında herhangi fark görülmemiştir. 14. günde yapılan değerlendirme sonucunda tedavilerin apoptotik hücre ölümünü azaltmasıyla birlikte bundan sorumlu hücre içi sinyal mekanizmasını anlamak için gen ve protein seviyesinde analizler yapılmıştır.

Ratlarda yapılan bir çalışmada OSA tıkanması sonrası, yaklaşık 30 gün sonra ipsilateral striatum ve korteks bölgelerinde atrofi görülmüştür (180). Benzer şekilde farelerde 30 dakikalık OSA tıkanması sonucunda uzun dönemde striatumda atrofi görülmüştür (181, 182). Uzun dönemde oluşan atrofının değerlendirilebilmesi için 55. gün kesitlerine *cresyl violet* boyaması yapılmıştır (96, 177). Bu boyama ile sadece nöronlar boyanabildiği için kesit üzerindeki hemisfer, korteks, striatum ve korpus kallozum alanlarının ölçülebilmesine imkan vermektedir. Korpus kallozum ve striatumdaki atrofiyi değerlendirebilmek için hasarsız hemisferdeki korpus kallozum

ve striatum alanları ölçülmüş ve bu değerlerden, hasarlı hemisferdeki korpus kallozum ve striatum alanları çıkarılmıştır. Elde edilen bu fark atrofi alanı olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CDNF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde atrofi alanını hem korpus kallozumda hem de striatumda düşürmüştür. Bu sonuçla apoptotik hücre ölümü birlikte değerlendirildiğinde ölen hücre sayısının azalmasıyla birlikte dokudaki hücre kaybının ve dolayısıyla atrofinin azaldığı düşünülmektedir.

BrdU immünoboyaması ile birlikte astrositler için GFAP, mikroglia için Iba-1, yeni oluşan nöronlar için DCX ve olgun nöronlar için NeuN çift immünoboyaması da yapılabileceği için iskemi sonrası hücresel proliferasyon profilinin gösterilmesi için bu BrdU enjeksiyonu ve sonrası BrdU'nun immünofloresan olarak boyanması literatürde kullanılmaktadır (179, 183). Hasarla ilgili mekanizmalarla ilgili olarak CDNF veya MANF tedavilerinin nörogenez ve gliogenez üzerine olan etkilerini ölçebilmek için, hasarının oluşturulmasından üç gün sonra başlamak üzere, üçer gün aralıklarla 100 mg/kg dozunda -DNA'nın yapısına katılan ve bölünen hücre işaretçisi olarak kullanılan- BrdU intraperitoneal olarak verilmiştir. 55 günün sonunda farelere yüksek doz anestezi altında serum fizyolojik ile perfüzyon ve % 4'lük PFA ile fiksasyon yapılmıştır. Daha sonra yeni oluşan nöronları gösterebilmek için BrdU/NeuN çift boyaması, yeni oluşan gliaları gösterebilmek için BrdU/GFAP çift boyaması yapılmış ve her iki immünoboyamada da pozitif veren hücre sayısı değerlendirilmiştir. Gruplar arası değerlendirme yapıldığında uzun dönemde kontrol grubuyla kıyaslandığında CDNF tedavisi yeni oluşan nöron sayısını istatistiksel olarak arttırmıştır (Şekil 6.4.1.). Tedaviyle birlikte herhangi bir kök hücre tedavisi yapılmadığından ve nöronların bölünmediği düşüldüğünden, CDNF tedavisini endojen olarak özellikle ventrikül altındaki bölgede bulunan kök hücrelerin farklılaşmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

İskemiden 6 gün sonra glial yaranın oluşmaya başladığı, GFAP+ hücrelerin iskemi sonrası ilk 6 günde morfolojilerini değiştirerek iskemik hat boyunca hasarın sınırına göç ederek yoğun bir şekilde toplandıkları ve hasarı sınırlandırmaya çalıştıkları bilinmektedir (183). Uzun dönemde yapılan değerlendirme sonucunda reaktif astroglia olduğu düşünülen hücre sayısı her iki tedavi sonucunda da artmıştır.

(Şekil 6.5.1.) Gliaların hasar üzerindeki rolleri arasında hem hasarı onarmadaki görevleri hem de aksonal uzamayı engelleyici görevleri bilinmektedir. Bu artışın glial yara oluşumu ile birlikte aksonal uzamayı etkileyip etkilemediğine bakmak için GFAP boyanan kesitlerde aynı zamanda yara alanı da değerlendirilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CDFN tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde oluşan yara alanını azalttığı görülmüştür (Şekil 6.6.1.).

Yapılan tedavilerin hücre içi sinyal mekanizmalarına olan etkisinin görülebilmesi için *Western Blot* yöntemi ile protein miktar analizi yapılmıştır. Hem zamana bağlı hem de gruplar arasındaki farklılıkların görülmesi amacıyla, protein ekspresyon çalışmaları için iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları kullanılmıştır. Hücre içinde ölüm ve hayatta kalımla ilgili Akt (Şekil 6.7.1.1), p44/-42 (Şekil 6.7.2.1.), p38 (Şekil 6.7.3.1.), p21 (Şekil 3.7.4.1.), eNOS (Şekil 6.7.5.1.), iNOS (Şekil 6.7.6.1.) ve plastisitede rol alan Versican (Şekil 6.7.7.1.) gibi protein seviyelerindeki değişikliklerin zamana bağlı analizi yapılmıştır. Fosfoinositit 3-kinaz ve fosfoinositit-bağımlı protein kinaz tarafından fosforlanan Akt'nin aktifleşmesinin apoptozu blokladığı düşünülmektedir (184, 185). AKT'nin fonksiyonunun *Wortmannin* veya *LY294002* gibi kimyasallarla inhibe edilmesi sonucu iskemik hasarın arttığı bilinmektedir (186, 187). Her ne kadar Akt'nin forforlanması aktifleştiği gösterse de forforlanma miktarı tam olarak aktiviteyi yansıtmamaktadır(188). p44/-42 olarak da bilinen Erk1/2'nin ise iskemi sonrası protektif rolü (189) olduğu kadar hasarı arttırdığı da gösterilmiştir (190, 191). Genel olarak Erk1/2'nin hücrel farklılaşmada, hücre proliferasyonunda ve apoptozun regülasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (192). Literatürde Erk1/2 için bulunan bu farklı rollerin, kullanılan iskemik modellerden ve iskemiden etkilenen hücre tipleriyle birlikte etkilenen bölgelerin farklılıklarından olduğu düşünülmektedir. Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında MANF tedavisinin iskemik striatumda fosfo-Akt ve fosfo p44/-42 seviyesini azalttığı görülmüştür. p38 proteininin stres, bakteriyel lipopolisakkaritler ve IL1 ve TNF gibi sitokinler tarafından aktive olarak, hücreyi ölüme götürdüğü bilinmektedir (193). Etkileyen ve etkilenen sinyal yolları tam olarak bilinmese de p38'in aktivasyonunun nöronları apoptoza götürdüğü ve inhibisyonun ise nöronal sağkalımı arttırdığı *in vitro*

çalışmalarda gösterilmiştir (194, 195). *Cyclin-dependent* kinaz (CDK) inhibitör olan p21 proteini, hücre döngüsü üzerine etki ederek nöronal kök hücre popülasyonunu kısıtladığı *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sebeple p21'in iskemi sonrası nöronal rejenerasyonu engellediği düşünölmektedir (196). Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında hem CDNF hem de MANF tedavileri fosfo-p38 ve p21 seviyesini azalttığı görölmüştür. Nitrik oksitin (NO) hem beyinde hem de periferal sinir sisteminde vaköler homeostasis ve kan akımının düzenleyici olduğu bilinmektedir. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz'ın (eNOS) inhibe edilmesinin serebral kanlanmayı azalttığı ve buna bağlı olarak dokudaki hasarı arttırdığı gösterilmiştir. eNOS'un seviyesinin hasar sonrası enfarktüs alanında arttığı bilinmesine rağmen, bunun etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (197). Endotelden salınan NO'nun damarlardaki platalet oluşumunu ve lökosit infiltrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (198). Fosforlanmış eNOS'tan NO üretiminin ise iskemi sonrası bölgesel kan akımını arttırabileceği düşünölmektedir. Sitokinlerle alakalı bir çok uyarının glial hücreleri uyararak, Ca<sup>2+</sup> bağmsız indöklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdıkları ve artan iNOS'un NO salınımını aşırı derecede arttırarak komşu nöronlara hasar verdiği bilinmektedir (199). İskemi sonrası glial hücrelerde iNOS ekspresyonunun arttığı bilindiği gibi, bunun inhibe edilmesinin de iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (200, 201). Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında MANF tedavisi eNOS seviyesini arttırırken, hem CDNF hem de MANF tedavisi iNOS seviyesini azalttığı görölmüştür.

Yapılan tedavilerin gen ekspresyon mekanizmalarına olan etkisinin görölebilmesi için qPCR yöntemi ile gen miktar analizi yapılmıştır. Hem zamana hem de gruplar arasındaki farklılıkların görölmesi amacıyla, gen ekspresyon çalışmaları için iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları ve korteksleri kullanılmıştır. Anti-enflamatuvar etkili genler (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9), plastisiteyi uyaran ve hücre yaşamını etkileyen genler (GAP43, CNTF, BDNF, CDNF, MANF) ve plastisiteyi etkileyen genler (Ncam1, Efrin A5, Efrin B1, Versican, Nörocan, Netrin-1) olmak üzere toplam 17 gendeki değişiklikler incelenmiştir.

İskemi sonrası artan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  gibi sitokin üretimi olduğu bilinmektedir (202). Bunlar içerisinde IL-1 $\beta$ 'in iskemik, ekzitotoksik ve travmatik beyin hasarını arttırdığı, muhtemelen glia ve nöronlar üzerinde olduğu gibi vasküler hücreler üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir (203). TNF- $\alpha$ 'nın ise hasar üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkisi olduğu düşünülmektedir. İskemi sonrası adenoviral vektör ile TGF- $\beta$ 'nin aşırı ekspres edilmesinin nöroprotektif rolü olduğu düşünülmektedir (204). Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi IL-1Beta ve TNF alfa seviyesini azaltmıştır (Tablo 6.8.1.1.-6.8.2.2) Benzer şekilde TGF-Beta1'in kontralateral striatum ve korteksteki seviyesi de CDNF tedavisi ve MANF tedavisi ile azalırken, ipsilateralde ise TGF-Beta1'in her iki bölgedeki seviyesi de artmıştır (Tablo 6.8.3.1-6.8.3.2).

MMP'lerin hücrelerarasındaki maddenin degradasyonunda görev alan enzimler olduğu bilinmekte ve merkezi sinir sisteminde hem fizyolojik hem de patofizyolojik şartlarda farklı görevleri olduğu düşünülmektedir. İskemi sonrası MMP9'un seviyesinin arttığı ve bunun da kan beyin bariyeri geçirgenliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (205). Literatürde yapılan bir çalışmada MMP9'un seviyesinin iskemiden 24 saat sonra en yüksek seviyeye çıktığı gösterilmiştir (206). VEGF'lerin iske mi sonrası vasküler regülasyonda önemli görevleri olduğu ve iske mi sonrası protein ekspresyonundaki artış bilinmektedir (207, 208). Her ne kadar akut hasarın tamamlanmasından sonra verildiğinde koruyucu etki görülse de akut dönemde VEGF tedavisinin kan beyin bariyeri geçirgenliğini bozduğu ve iskemik hasarı arttırdığı bilinmektedir (209, 210). Hipoksi ve enflamasyon sonrası artan VEGF-A ekspresyonun düz kas hücrelerini uyararak ve göç etmelerini sağlayarak yeni damar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (211). VEGF-A ekspres eden adenoviral vektörün iskemik hasardan üç gün sonra verilmesi sonucu nörolojik olarak iyi sonuçlar alınırken, hasarın da azaldığı görülmüştür (212). VEGF-B'nin ise endotelial hücrelerin yağ asidi alımını regüle ettiği düşünülmektedir (211). VEGF-B ekspres etmeyen farelerde yapılan OSA oklüzyonu sonunda ise enfarktüs hacminin kontrole göre % 40 daha fazla olduğu ve nörolojik fonksiyonda bozulmalar görülmüştür (213). Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi damarlaşma ile ilgili önemli bir büyüme faktörü olan

VEGF A seviyesini (Tablo 6.8.4.1.-6.8.4.2.) ve VEGF B seviyesini (Tablo 6.8.5.1.-6.8.5.2.) arttırken bu artış bir tek kontralateral kortekste MANF tedavisi ile görülmemiştir. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi MMP9 (Tablo 6.8.6.1-6.8.6.2.) arttırken bu artış bir tek ipsilateral kortekste CDNF tedavisi ile görülmemiştir.

Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan GAP43'ün seviyesini (Tablo 6.8.7.1.-6.8.7.2.) arttırmıştır. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan CNTF'nin seviyesini (Tablo 6.8.8.1.-6.8.8.2.) azaltmıştır. Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan BDNF'nin seviyesini (Tablo 6.8.9.1-6.8.9.2.) azaltmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi BDNF'nin seviyesini arttırken, MANF tedavisi ise düşürmüştür. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan CDNF'nin seviyesini (Tablo 6.8.10.1-6.8.10.2.) azaltırken, CDNF tedavisi, ipsilateral striatum ve kortekste, kontralateralde ise sadece striatumda arttırmıştır. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan MANF'ın seviyesini (Tablo 6.8.11.1.-6.8.11.2.) azaltmıştır.

Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi plastisiteyi pozitif yönde etkileyen bir protein olan Ncam1'in seviyesini (Tablo 6.8.12.1.-6.8.12.2.) arttırmıştır. Plastisitenin düzenlenmesinde morfolojik olarak görev alan bu protein hem sinapsın yapısının korunmasını hem de yeni sinapslar oluşturacak mekanizmalarda görev aldığı düşünülmektedir (214). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Efrin A5'in seviyesini (Tablo 6.8.13.1.) arttırmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste ise CDNF tedavisi ve MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini azaltmıştır (Tablo 6.8.13.2.). Uzun dönemde ipsilateral kortekste ve kontralateral striatumda hem

CDNF hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı regüle eden bir protein olan Efrin B1'in seviyesini arttırmıştır (Tablo 6.8.14.1.-6.8.14.2.). İpsilateral striatumda ve kontralateral kortekste CDFN tedavisi Efrin B1'in seviyesini arttırırken, MANF tedavisi ise azaltmıştır (Tablo 6.8.14.1.-6.8.14.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDFN hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Versican'ın seviyesini arttırmıştır (Tablo 6.8.15.1.). Kontralateral striatum ve kortekste ise hem CDFN hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini azaltmıştır (Tablo 6.8.15.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDFN hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Nörocan'ın seviyesini arttırmıştır (Tablo 6.8.16.1.). Kontralateralde ise hem striatum hem de kortekste CDFN tedavisi Nörocan'ın seviyesini arttırırken, MANF tedavisi ise düşürmüştür (Tablo 6.8.16.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDFN hem de MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini azaltmıştır (Tablo 6.8.17.1.). Bundan farklı olarak sadece ipsilateral kortekste MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini azaltmamış, arttırmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste ise hem CDFN hem de MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini arttırmıştır. (Tablo 6.8.17.2.).

Reaktif astrositlerin anterograd dejenerasyonda hasar sonrası ortamdaki hücre kalıntılarının fagositozla temizlenmesi gibi önemli görevleri bilinmektedir. Bu temizlik olmaksızın yeni akson uzamasını mümkün değildir. Ancak bu temizlik sırasında astrositler tarafından ekspres edilen bazı proteinlerin de aksonal uzamayı inhibe ettiği bilinmektedir (215-217). Efrin B1 ve Efrin B reseptörlerinin reaktif astrositlerde yüksek miktarda ekspres edildiği ve bu miktarın hasardan 30 gün sonra bile hala yüksek olduğu daha önce gösterilmiştir (218). Bu mekanizmaların dışında reaktif astrositlerin oluşturduğu glial yara nedeniyle iskemi sonrası yeni akson oluşumunun ve filizlenmesinin (*sprouting*) inhibe edildiği bilinmektedir. Bu mekanizma içerisinde kondroitin sulfat proteoglikanlarının bulunduğu daha önce gösterilmiştir (219). Bunlar içerisinde olan Efrin A5'in seviyesinin bloklanması aksonal plastisite için önem kazanmaktadır. Benzer şekilde glial yara içerisinde hem reaktif astrositlerin miktarının arttığı hem de akson uzamasını inhibe eden Nörocan (220-222) ve Versican (223-225) gibi proteinleri arttırdığı gösterilmiştir. İskemi sonrası iskemiye kontralateral korteksten iskemik korteks, beyin kökü ve omurilikteki

bölgelere doğru yeni aksonlar uzadığı bilinmektedir (94, 226, 227). Endojen olarak gerçekleşen bu mekanizmanın sonucunda da fonksiyonel geri kazanımın etkilendiği ve bir şekilde plastisiteyi etkileyen proteinlerin de fonksiyonel geri kazanım için önemli olduğu düşünülmektedir. Akson uzamasını engelleyen proteinlerin inhibe edilmesi sonucu fonksiyonel geri kazanımda; motor koordinasyonun ve el çekme gücünün düzelmesinde ve anksiyetinin azalmasında pozitif sonuçlar alınacağı hipotez edilmiştir (219). Merkezi sinir sisteminin gelişimsel evresinde netrin ailesine ait proteinlerin hücre göçünde ve aksonların hedeflerini bulmasında görev aldıkları bilinmektedir (228, 229). Bununla birlikte hem fizyolojik şartlarda hem de patofizyolojik şartlarda netrin ekspresyonu olduğu ve netrinlerin böbrek iskemisinde, miyokardiyal enfarktüste ve apoptoz önlemedeki koruyucu görevleri bilinmektedir (230, 231). Ayrıca ratlarda yapılan bir çalışmada, tüm beyni etkileyen global iskemi sonrası hipokampüse netrin-1 enjekte edildiğinde hafızadaki bozulmayı ve sinaptik düzensizlikleri giderdiği gösterilmiştir (232).

Fonksiyonel nörolojik iyileşme operasyondan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan el çekme/kavrama gücü, rotarod motor koordinasyon, yükseltilmiş O-labirenti ve açık alan testleri ile değerlendirilmiştir. İlk davranış testleri beyin felcinden önce taban çizgi (*baseline*) oluşturması amacıyla yapılmıştır. İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ölçülebilmesi ve sağ ön tek pençenin kavrama gücünü ölçmek için el çekme/kavrama gücü testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 6.9.2.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. Uzun dönemdeki iyileşme incelendiğinde 42. günde CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 6.9.2.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve motor koordinasyonun ölçülebilmesi için rotarod testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 6.9.3.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. Uzun dönemdeki iyileşme incelendiğinde 42. günde CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil



6.9.3.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve anksiyete ve korkuyu ölçmek için el yükseltilmiş o-labirenti testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 6.9.4.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. İskeminin etkilediği bölgeden kaynaklı hasar sonrası *in vivo* iskemik hayvanlarda ve klinikte hastalarda görülen anksiyete benzeri davranış; bu teste kapalı alanda geçirilen süre olarak yansımaktadır. Şekilde görüldüğü üzere iskemi öncesi hayvanlar açık alanda zaman geçirirken, iskemik hasarın en çok görüldüğü 3. günde açık alanda zaman geçirmeyi tercih etmemişlerdir. Bu durum zamanla herhangi bir tedavi olmasa da düzelse de uzun dönemde hem CDF hem de MANF tedavileri açık alanda geçirilen süreyi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırarak, oluşan anksiyete ve korkuyu azaltmıştır (Şekil 6.9.4.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve spontan motor aktivitelerin ve araştırma benzeri davranışların ölçülebilmesi için açık alan testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 6.9.5.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. İskeminin etkilediği bölgeden kaynaklı hasar sonrası *in vivo* iskemik hayvanlarda ve klinikte hastalarda görülen spontan hareketliliğin azalması; bu teste hareketli kalınan süre olarak ölçülebilmektedir. İskemi öncesiyle kıyaslandığında, iskemi sonrası hareketlilik süresi düşmekte ve bu düşüş zamanla düzelmektedir. Uzun dönemde MANF tedavisi bu düşüşü istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştır (Şekil 6.9.5.1.). Yine bu testle belirlenebilen hayvanların kenar (Şekil 6.9.5.2.), geçiş (Şekil 6.9.5.3.) ve merkez (Şekil 6.9.5.4.) gibi farklı bölgelerde geçirdikleri sürenin de değerlendirilmesiyle anksiyete ve korku benzeri davranışlar incelenmiştir. İskemi sonrası hayvanlar kenar bölgesinde testin yüksek duvarlarının yanında zaman geçirmeyi bu alanda kendilerini daha güvende hissettikleri için tercih etmektedirler. Kontrol grubuyla kıyaslandığında uzun dönemde hem CDF tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kenar bölgesinde geçirilen süreyi azaltmıştır (Şekil 6.9.5.2.). Laboratuvar hayvanlarında kendi içlerinden gelen araştırma benzeri davranışlar ve yeni yerleri

keşfetme içgüdüğü vardır. Bu gibi davranışlar da bu teste geçiş ve merkez alanında geçirdikleri süreler olarak yansımaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında uzun dönemde hem CDFN tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da geçiş ve merkez alanında geçirilen süreyi arttırmıştır (Şekil 6.9.5.3.-6.9.5.4.).

Uzun dönemde aksonal projeksiyonun belirlenmesi için 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvandan alınan kesitler immüno Floresan yöntemi ile boyanmış ve kontralateralden ipsilaterale geçebilen aksonlar değerlendirilmiştir. Akut olarak iskemik bölgedeki nöronların hayatta kalımını sağlamak ve apoptotik hücre ölümünü azaltmak kadar kronik dönemde kontralateralden ipsilateral akson uzamasını sağlamak da tercih edilen tedavi mekanizmaları arasında yer almaktadır. Uzun dönemde görülen davranış testlerinin sonuçlarıyla paralel olarak kontrol grubuyla kıyaslandığında hem CDFN tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde aksonal projeksiyonu arttırmıştır (Şekil 6.10.1.). Literatürde daha önce özellikle immünohistokimya boyamaları kullanılarak yapılan çalışmalarda, fokal iske mi sonrası iskemik hemisferde kısa mesafe de olsa aksonal uzamanın olduğu (233) tarafından ve yeni dentrit oluşumu gösterilmiştir (234). Bu sonuçlar CDFN ve MANF'ın kontralateral hemisferde yeniden doku modellenmesinde görev alarak aksonal uzamayı sağladığını göstermektedir.

## 8. SONUÇ

Tüm bu datalar incelendiğinde iskemi sonrası hem CDFN hem de MANF tedavisinin apoptotik hücre sayısını azalttığı, yeni nöron oluşumunu arttırdığı, glial yara alanını düşürdüğü, motor koordinasyon ve el çekme/kavrama gücünü arttırarak fonksiyonel geri kazanımı sağladığı ve özellikle kontralateral striatumda gen ve protein seviyesinde yaptığı değişiklikler sayesinde aksonal uzamayı arttırarak plastisiteyi sağladığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, CDFN ve MANF gibi diğer nörotrofik faktörlerden hem daha küçük hem de daha farklı bir yapıya sahip olan iki nörotrofik faktörün iskemik hasarda zamana bağlı olarak etki ettiği mekanizmaların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Zamana bağlı olarak hasara ve plastisiteye etki eden mekanizmaların araştırılmasıyla birlikte elde edilen bilgilerle bu nörotrofik faktörlerin veya benzer mekanizmaları kullanabilecek başka hedef moleküllerin translasyonel çalışmalarda kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Donnan, GA, Fisher, M, Macleod, M, and Davis, SM. Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623. (2008).
2. Mauldin, PD, Simpson, KN, Palesch, YY, Spilker, JS, Hill, MD, Khatri, P, et al. Design of the economic evaluation for the Interventional Management of Stroke (III) trial. *Int J Stroke* **3**, 138-144. (2008).
3. Adeoye, O, Pancioli, A, Khoury, J, Moomaw, CJ, Schmit, P, Ewing, I, et al. Efficiency of enrollment in a successful phase II acute stroke clinical trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **21**, 667-672. (2012).
4. Moskowitz, MA, Lo, EH, and Iadecola, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* **67**, 181-198. (2010).
5. Adams, HP, Jr., Bendixen, BH, Kappelle, LJ, Biller, J, Love, BB, Gordon, DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35-41. (1993).
6. Reeves, MJ, Arora, S, Broderick, JP, Frankel, M, Heinrich, JP, Hickenbottom, S, et al. Acute stroke care in the US: results from 4 pilot prototypes of the Paul Coverdell National Acute Stroke Registry. *Stroke* **36**, 1232-1240. (2005).
7. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397. (1999).
8. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79**, 1431-1568. (1999).
9. Kanemitsu, H, Nakagomi, T, Tamura, A, Tsuchiya, T, Kono, G, and Sano, K. Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1196-1204. (2002).
10. Doyle, KP, Simon, RP, and Stenzel-Poore, MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310-318. (2008).
11. Hossmann, KA. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1310-1316. (2012).
12. Hatano, S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ* **54**, 541-553. (1976).
13. Liu, B, Liao, M, Mielke, JG, Ning, K, Chen, Y, Li, L, et al. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* **26**, 5309-5319. (2006).
14. Peng, PL, Zhong, X, Tu, W, Soundarapandian, MM, Molner, P, Zhu, D, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* **49**, 719-733. (2006).
15. Berdichevsky, E, Riveros, N, Sanchez-Armass, S, and Orrego, F. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci Lett* **36**, 75-80. (1983).
16. Molinaro, P, Cantile, M, Cuomo, O, Secondo, A, Pannaccione, A, Ambrosino, P, et al. Neuounina-1, a novel compound that increases Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger activity, effectively protects against stroke damage. *Mol Pharmacol* **83**, 142-156. (2013).

17. Beckman, KB, and Ames, BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 118-127. (1998).
18. Allen, CL, and Bayraktutan, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* **4**, 461-470. (2009).
19. Kontos, HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* **32**, 2712-2716. (2001).
20. Forstermann, U, Boissel, JP, and Kleinert, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**, 773-790. (1998).
21. Beckman, JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* **9**, 836-844. (1996).
22. Dziedzic, T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* **15**, 523-531. (2015).
23. Amantea, D, Nappi, G, Bernardi, G, Bagetta, G, and Corasaniti, MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J* **276**, 13-26. (2009).
24. Kriz, J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol* **18**, 145-157. (2006).
25. Barrington, J, Lemarchand, E, and Allan, SM. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology? *Brain Pathol* **27**, 205-212. (2017).
26. Mohamed, IN, Ishrat, T, Fagan, SC, and El-Remessy, AB. Role of inflammasome activation in the pathophysiology of vascular diseases of the neurovascular unit. *Antioxid Redox Signal* **22**, 1188-1206. (2015).
27. Passaro, D, Rana, G, Piscopo, M, Viggiano, E, De Luca, B, and Fucci, L. Epigenetic chromatin modifications in the cortical spreading depression. *Brain Res* **1329**, 1-9. (2010).
28. Rana, G, Donizetti, A, Virelli, G, Piscopo, M, Viggiano, E, De Luca, B, et al. Cortical spreading depression differentially affects lysine methylation of H3 histone at neuroprotective genes and retrotransposon sequences. *Brain Res* **1467**, 113-119. (2012).
29. Horiguchi, T, Snipes, JA, Kis, B, Shimizu, K, and Busija, DW. Cyclooxygenase-2 mediates the development of cortical spreading depression-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* **140**, 723-730. (2006).
30. Koroleva, VI, Korolev, OS, Loseva, E, and Bures, J. The effect of MK-801 and of brain-derived polypeptides on the development of ischemic lesion induced by photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in rats. *Brain Res* **786**, 104-114. (1998).
31. Taga, K, Patel, PM, Drummond, JC, Cole, DJ, and Kelly, PJ. Transient neuronal depolarization induces tolerance to subsequent forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology* **87**, 918-925. (1997).
32. Adhami, F, Liao, G, Morozov, YM, Schloemer, A, Schmithorst, VJ, Lorenz, JN, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol* **169**, 566-583. (2006).
33. Puyal, J, and Clarke, PG. Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage. *Autophagy* **5**, 1060-1061. (2009).

34. Rami, A, Langhagen, A, and Steiger, S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis* **29**, 132-141. (2008).
35. Unal-Cevik, I, Kilinc, M, Can, A, Gursoy-Ozdemir, Y, and Dalkara, T. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 2189-2194. (2004).
36. Vandenabeele, P, Galluzzi, L, Vanden Berghe, T, and Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 700-714. (2010).
37. Wei, L, Ying, DJ, Cui, L, Langsdorf, J, and Yu, SP. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res* **1022**, 54-61. (2004).
38. Adams, JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-2495. (2003).
39. Hickey, EJ, You, X, Kaimaktchiev, V, Stenzel-Poore, M, and Ungerleider, RM. Lipopolysaccharide preconditioning induces robust protection against brain injury resulting from deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* **133**, 1588-1596. (2007).
40. Nikolettoulou, V, Markaki, M, Palikaras, K, and Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3448-3459. (2013).
41. Broughton, BR, Reutens, DC, and Sobey, CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-339. (2009).
42. Li, H, Colbourne, F, Sun, P, Zhao, Z, Buchan, AM, and Iadecola, C. Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* **31**, 176-182. (2000).
43. del Zoppo, G, Ginis, I, Hallenbeck, JM, Iadecola, C, Wang, X, and Feuerstein, GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* **10**, 95-112. (2000).
44. del Zoppo, GJ. Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **823**, 132-147. (1997).
45. Green, DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674. (2005).
46. Edinger, AL, and Thompson, CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 663-669. (2004).
47. Fiuza, C, Bustin, M, Talwar, S, Tropea, M, Gerstenberger, E, Shelhamer, JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* **101**, 2652-2660. (2003).
48. Declercq, W, Vanden Berghe, T, and Vandenabeele, P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* **138**, 229-232. (2009).
49. Yoshimori, T. Autophagy: paying Charon's toll. *Cell* **128**, 833-836. (2007).
50. Mizushima, N, Yamamoto, A, Matsui, M, Yoshimori, T, and Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-1111. (2004).
51. Komatsu, M, Ueno, T, Waguri, S, Uchiyama, Y, Kominami, E, and Tanaka, K. Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ* **14**, 887-894. (2007).

52. Hacke, W, Kaste, M, Bluhmki, E, Brozman, M, Davalos, A, Guidetti, D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-1329. (2008).
53. Yarbrough, CK, Ong, CJ, Beyer, AB, Lipsey, K, and Derdeyn, CP. Endovascular Thrombectomy for Anterior Circulation Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* **46**, 3177-3183. (2015).
54. Calvert, JW, Cahill, J, and Zhang, JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology. *Neurol Res* **29**, 132-141. (2007).
55. Parmar, S, Moore-Langston, S, Fredrickson, V, Kim, JM, Rastogi, R, Elmadoun, O, et al. Neuroprotective mechanisms of oxygen and ethanol: a potential combination therapy in stroke. *Curr Med Chem* **22**, 1194-1204. (2015).
56. Liu, S, Liu, W, Ding, W, Miyake, M, Rosenberg, GA, and Liu, KJ. Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 1274-1284. (2006).
57. Geng, X, Fu, P, Ji, X, Peng, C, Fredrickson, V, Sy, C, et al. Synergetic neuroprotection of normobaric oxygenation and ethanol in ischemic stroke through improved oxidative mechanism. *Stroke* **44**, 1418-1425. (2013).
58. Geng, X, Parmar, S, Li, X, Peng, C, Ji, X, Chakraborty, T, et al. Reduced apoptosis by combining normobaric oxygenation with ethanol in transient ischemic stroke. *Brain Res* **1531**, 17-24. (2013).
59. Shin, HK, Dunn, AK, Jones, PB, Boas, DA, Lo, EH, Moskowitz, MA, et al. Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain* **130**, 1631-1642. (2007).
60. Singhal, AB, Wang, X, Sumii, T, Mori, T, and Lo, EH. Effects of normobaric hyperoxia in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 861-868. (2002).
61. Ding, Z, Tong, WC, Lu, XX, and Peng, HP. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: a review. *Interv Neurol* **2**, 201-211. (2014).
62. Wang, Y, Chen, D, and Chen, G. Hyperbaric oxygen therapy applied research in traumatic brain injury: from mechanisms to clinical investigation. *Med Gas Res* **4**, 18. (2014).
63. Matchett, GA, Martin, RD, and Zhang, JH. Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms. *Neurol Res* **31**, 114-121. (2009).
64. Nemoto, EM, and Betterman, K. Basic physiology of hyperbaric oxygen in brain. *Neurol Res* **29**, 116-126. (2007).
65. Zhang, JH, Lo, T, Mychaskiw, G, and Colohan, A. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology* **12**, 63-77. (2005).
66. Demchenko, IT, Boso, AE, O'Neill, TJ, Bennett, PB, and Piantadosi, CA. Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol (1985)* **88**, 1381-1389. (2000).
67. Demchenko, IT, Oury, TD, Crapo, JD, and Piantadosi, CA. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res* **91**, 1031-1037. (2002).
68. Bernaudin, M, Nedelec, AS, Divoux, D, MacKenzie, ET, Petit, E, and Schumann-Bard, P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent

- cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 393-403. (2002).
69. Rosell, A, and Lo, EH. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 82-89. (2008).
  70. Zhao, BQ, Wang, S, Kim, HY, Storrie, H, Rosen, BR, Mooney, DJ, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* **12**, 441-445. (2006).
  71. Brooks, KJ, Hargreaves, I, Bhakoo, K, Sellwood, M, O'Brien, F, Noone, M, et al. Delayed hypothermia prevents decreases in N-acetylaspartate and reduced glutathione in the cerebral cortex of the neonatal pig following transient hypoxia-ischaemia. *Neurochem Res* **27**, 1599-1604. (2002).
  72. Karabiyikoglu, M, Han, HS, Yenari, MA, and Steinberg, GK. Attenuation of nitric oxide synthase isoform expression by mild hypothermia after focal cerebral ischemia: variations depending on timing of cooling. *J Neurosurg* **98**, 1271-1276. (2003).
  73. Stefanutti, G, Pierro, A, Vinardi, S, Spitz, L, and Eaton, S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* **24**, 159-164. (2005).
  74. Ostadal, P, Mlcek, M, Kruger, A, Horakova, S, Skabradova, M, Holy, F, et al. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med* **11**, 124. (2013).
  75. Dohi, K, Miyamoto, K, Fukuda, K, Nakamura, S, Hayashi, M, Ohtaki, H, et al. Status of systemic oxidative stress during therapeutic hypothermia in patients with post-cardiac arrest syndrome. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 562429. (2013).
  76. Hamann, GF, Burggraf, D, Martens, HK, Liebetau, M, Jager, G, Wunderlich, N, et al. Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 764-769. (2004).
  77. Tang, XN, Liu, L, Koike, MA, and Yenari, MA. Mild hypothermia reduces tissue plasminogen activator-related hemorrhage and blood brain barrier disruption after experimental stroke. *Ther Hypothermia Temp Manag* **3**, 74-83. (2013).
  78. Cechmanek, BK, Tuor, UI, Rushforth, D, and Barber, PA. Very Mild Hypothermia (35 degrees C) Postischemia Reduces Infarct Volume and Blood/Brain Barrier Breakdown Following tPA Treatment in the Mouse. *Ther Hypothermia Temp Manag* **5**, 203-208. (2015).
  79. Ji, X, Luo, Y, Ling, F, Stetler, RA, Lan, J, Cao, G, et al. Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. *Front Biosci* **12**, 1737-1747. (2007).
  80. Zgavc, T, Ceulemans, AG, Hachimi-Idrissi, S, Kooijman, R, Sarre, S, and Michotte, Y. The neuroprotective effect of post ischemic brief mild hypothermic treatment correlates with apoptosis, but not with gliosis in endothelin-1 treated rats. *BMC Neurosci* **13**, 105. (2012).



81. Kollmar, R, and Schwab, S. Hypothermia and Ischemic Stroke. *Curr Treat Options Neurol* (2012).
82. Cuccione, E, Padovano, G, Versace, A, Ferrarese, C, and Beretta, S. Cerebral collateral circulation in experimental ischemic stroke. *Exp Transl Stroke Med* **8**, 2. (2016).
83. Dirnagl, U, Kaplan, B, Jacewicz, M, and Pulsinelli, W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 589-596. (1989).
84. Kilic, E, Bahr, M, and Hermann, DM. Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations. *Stroke* **32**, 2641-2647. (2001).
85. Watson, NA, Beards, SC, Altaf, N, Kassner, A, and Jackson, A. The effect of hyperoxia on cerebral blood flow: a study in healthy volunteers using magnetic resonance phase-contrast angiography. *Eur J Anaesthesiol* **17**, 152-159. (2000).
86. Jackman, K, and Iadecola, C. Neurovascular regulation in the ischemic brain. *Antioxid Redox Signal* **22**, 149-160. (2015).
87. Bang, OY, Saver, JL, Buck, BH, Alger, JR, Starkman, S, Ovbiagele, B, et al. Impact of collateral flow on tissue fate in acute ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**, 625-629. (2008).
88. Koroshetz, WJ. Imaging stroke in progress. *Ann Neurol* **39**, 283-284. (1996).
89. Tagaya, M, Liu, KF, Copeland, B, Seiffert, D, Engler, R, Garcia, JH, et al. DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. *Stroke* **28**, 1245-1254. (1997).
90. Lees, KR. Cerestat and other NMDA antagonists in ischemic stroke. *Neurology* **49**, S66-69. (1997).
91. Bustamante, A, Garcia-Berrocoso, T, Rodriguez, N, Llombart, V, Ribo, M, Molina, C, et al. Ischemic stroke outcome: A review of the influence of post-stroke complications within the different scenarios of stroke care. *Eur J Intern Med* **29**, 9-21. (2016).
92. Thompson, DD, Murray, GD, Sudlow, CL, Dennis, M, and Whiteley, WN. Comparison of statistical and clinical predictions of functional outcome after ischemic stroke. *PLoS One* **9**, e110189. (2014).
93. Wishaw, IQ. Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology* **39**, 788-805. (2000).
94. Chen, P, Goldberg, DE, Kolb, B, Lanser, M, and Benowitz, LI. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9031-9036. (2002).
95. Liu, Z, Zhang, RL, Li, Y, Cui, Y, and Chopp, M. Remodeling of the corticospinal innervation and spontaneous behavioral recovery after ischemic stroke in adult mice. *Stroke* **40**, 2546-2551. (2009).
96. Reitmeir, R, Kilic, E, Kilic, U, Bacigaluppi, M, ElAli, A, Salani, G, et al. Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity. *Brain* **134**, 84-99. (2011).
97. Takatsuru, Y, Fukumoto, D, Yoshitomo, M, Nemoto, T, Tsukada, H, and Nabekura, J. Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical

- hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci* **29**, 10081-10086. (2009).
98. Zai, L, Ferrari, C, Subbaiah, S, Havton, LA, Coppola, G, Strittmatter, S, et al. Inosine alters gene expression and axonal projections in neurons contralateral to a cortical infarct and improves skilled use of the impaired limb. *J Neurosci* **29**, 8187-8197. (2009).
  99. Enzinger, C, Johansen-Berg, H, Dawes, H, Bogdanovic, M, Collett, J, Guy, C, et al. Functional MRI correlates of lower limb function in stroke victims with gait impairment. *Stroke* **39**, 1507-1513. (2008).
  100. Zemke, AC, Heagerty, PJ, Lee, C, and Cramer, SC. Motor cortex organization after stroke is related to side of stroke and level of recovery. *Stroke* **34**, e23-28. (2003).
  101. Brown, CE, Aminoltejari, K, Erb, H, Winship, IR, and Murphy, TH. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci* **29**, 1719-1734. (2009).
  102. Ueno, Y, Chopp, M, Zhang, L, Buller, B, Liu, Z, Lehman, NL, et al. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke* **43**, 2221-2228. (2012).
  103. Winship, IR, and Murphy, TH. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J Neurosci* **28**, 6592-6606. (2008).
  104. Bidmon, HJ, Jancsik, V, Schleicher, A, Hagemann, G, Witte, OW, Woodhams, P, et al. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* **82**, 397-420. (1998).
  105. Wake, H, Moorhouse, AJ, Jinno, S, Kohsaka, S, and Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* **29**, 3974-3980. (2009).
  106. Lively, S, and Schlichter, LC. SC1/hevin identifies early white matter injury after ischemia and intracerebral hemorrhage in young and aged rats. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 480-493. (2012).
  107. Moxon-Emre, I, and Schlichter, LC. Evolution of inflammation and white matter injury in a model of transient focal ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 1-15. (2010).
  108. Souza-Rodrigues, RD, Costa, AM, Lima, RR, Dos Santos, CD, Picanco-Diniz, CW, and Gomes-Leal, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. *Brain Res* **1200**, 78-88. (2008).
  109. Zhang, L, Chopp, M, Zhang, RL, Wang, L, Zhang, J, Wang, Y, et al. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PLoS One* **5**, e11016. (2010).
  110. Shen, LH, Li, Y, Chen, J, Zhang, J, Vanguri, P, Borneman, J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience* **137**, 393-399. (2006).
  111. Bayat, M, Sharifi, MD, Haghani, M, and Shabani, M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. *Brain Res Bull* **119**, 34-40. (2015).

112. Bondi, CO, Klitsch, KC, Leary, JB, and Kline, AE. Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **31**, 873-888. (2014).
113. Johansson, BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. *Restor Neurol Neurosci* **22**, 163-174. (2004).
114. Mering, S, and Jolkkonen, J. Proper housing conditions in experimental stroke studies-special emphasis on environmental enrichment. *Front Neurosci* **9**, 106. (2015).
115. Nithianantharajah, J, and Hannan, AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 697-709. (2006).
116. Leggio, MG, Mandolesi, L, Federico, F, Spirito, F, Ricci, B, Gelfo, F, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* **163**, 78-90. (2005).
117. Xu, X, Ye, L, and Ruan, Q. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**, 296-305. (2009).
118. Lu, B, Nagappan, G, Guan, X, Nathan, PJ, and Wren, P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **14**, 401-416. (2013).
119. Tarsa, L, and Goda, Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1012-1016. (2002).
120. Gobbo, OL, and O'Mara, SM. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res* **152**, 231-241. (2004).
121. Hirata, K, Kuge, Y, Yokota, C, Harada, A, Kokame, K, Inoue, H, et al. Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model. *Neurosci Lett* **495**, 210-215. (2011).
122. Sun, H, Zhang, J, Zhang, L, Liu, H, Zhu, H, and Yang, Y. Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res* **7**, 268-280. (2010).
123. Zhu, JM, Zhao, YY, Chen, SD, Zhang, WH, Lou, L, and Jin, X. Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *J Int Med Res* **39**, 488-498. (2011).
124. Drescher, U, Kremoser, C, Handwerker, C, Loschinger, J, Noda, M, and Bonhoeffer, F. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* **82**, 359-370. (1995).
125. Ren, L, Zhang, WA, Fang, NY, and Wang, JX. The influence of electroacupuncture on neural plasticity in acute cerebral infarction. *Neurol Res* **30**, 985-989. (2008).
126. Ethell, IM, and Pasquale, EB. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* **75**, 161-205. (2005).

127. Catchpole, T, and Henkemeyer, M. EphB2 tyrosine kinase-dependent forward signaling in migration of neuronal progenitors that populate and form a distinct region of the dentate niche. *J Neurosci* **31**, 11472-11483. (2011).
128. Conover, JC, Doetsch, F, Garcia-Verdugo, JM, Gale, NW, Yancopoulos, GD, and Alvarez-Buylla, A. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* **3**, 1091-1097. (2000).
129. Cirulli, V, and Yebra, M. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 296-306. (2007).
130. Ramkhelawon, B, Yang, Y, van Gils, JM, Hewing, B, Rayner, KJ, Parathath, S, et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1180-1188. (2013).
131. Benowitz, LI, and Perrone-Bizzozero, NI. The expression of GAP-43 in relation to neuronal growth and plasticity: when, where, how, and why? *Prog Brain Res* **89**, 69-87. (1991).
132. Coggins, PJ, and Zwiers, H. B-50 (GAP-43): biochemistry and functional neurochemistry of a neuron-specific phosphoprotein. *J Neurochem* **56**, 1095-1106. (1991).
133. Skene, JH. Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* **12**, 127-156. (1989).
134. Strittmatter, SM, Vartanian, T, and Fishman, MC. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. *J Neurobiol* **23**, 507-520. (1992).
135. Curtis, R, Averill, S, Priestley, JV, and Wilkin, GP. The distribution of GAP-43 in normal rat spinal cord. *J Neurocytol* **22**, 39-50. (1993).
136. Kruger, L, Bendotti, C, Rivolta, R, and Samanin, R. GAP-43 mRNA localization in the rat hippocampus CA3 field. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 267-272. (1992).
137. Burry, RW, and Perrone-Bizzozero, NI. Nerve growth factor stimulates GAP-43 expression in PC12 cell clones independently of neurite outgrowth. *J Neurosci Res* **36**, 241-251. (1993).
138. Jap Tjoen San, ER, Schmidt-Michels, M, Oestreicher, AB, Gispén, WH, and Schotman, P. Inhibition of nerve growth factor-induced B-50/GAP-43 expression by antisense oligomers interferes with neurite outgrowth of PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 839-846. (1992).
139. Aigner, L, Arber, S, Kapfhammer, JP, Laux, T, Schneider, C, Botteri, F, et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* **83**, 269-278. (1995).
140. Strittmatter, SM, Fankhauser, C, Huang, PL, Mashimo, H, and Fishman, MC. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* **80**, 445-452. (1995).
141. Vaudano, E, Campbell, G, Anderson, PN, Davies, AP, Woolhead, C, Schreyer, DJ, et al. The effects of a lesion or a peripheral nerve graft on GAP-43 upregulation in the adult rat brain: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Neurosci* **15**, 3594-3611. (1995).

142. Kawahara, N, Ruetzler, CA, Mies, G, and Klatzo, I. Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor. *Exp Neurol* **158**, 27-36. (1999).
143. Rangel, YM, Kariko, K, Harris, VA, Duvall, ME, and Welsh, FA. Dose-dependent induction of mRNAs encoding brain-derived neurotrophic factor and heat-shock protein-72 after cortical spreading depression in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **88**, 103-112. (2001).
144. Kawahara, N, Croll, SD, Wiegand, SJ, and Klatzo, I. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res* **29**, 37-47. (1997).
145. Dzielko, M, Derugin, N, Wendland, MF, Vexler, ZS, and Ferriero, DM. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl Stroke Res* **4**, 189-200. (2013).
146. Holzer, LA, Cor, A, Pfandlsteiner, G, and Holzer, G. Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1alpha in Dupuytren's disease. *Acta Orthop* **84**, 420-425. (2013).
147. Morgan, R, Kreipke, CW, Roberts, G, Bagchi, M, and Rafols, JA. Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurol Res* **29**, 375-381. (2007).
148. Arai, K, Jin, G, Navaratna, D, and Lo, EH. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J* **276**, 4644-4652. (2009).
149. Xiong, Y, Zhang, Y, Mahmood, A, Meng, Y, Qu, C, and Chopp, M. Erythropoietin mediates neurobehavioral recovery and neurovascular remodeling following traumatic brain injury in rats by increasing expression of vascular endothelial growth factor. *Transl Stroke Res* **2**, 619-632. (2011).
150. Shimotake, J, Derugin, N, Wendland, M, Vexler, ZS, and Ferriero, DM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke* **41**, 343-349. (2010).
151. Zhao, H, Bao, XJ, Wang, RZ, Li, GL, Gao, J, Ma, SH, et al. Postacute ischemia vascular endothelial growth factor transfer by transferrin-targeted liposomes attenuates ischemic brain injury after experimental stroke in rats. *Hum Gene Ther* **22**, 207-215. (2011).
152. Yang, P, Arnold, SA, Habas, A, Hetman, M, and Hagg, T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci* **28**, 2231-2241. (2008).
153. Emsley, JG, and Hagg, T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* **183**, 298-310. (2003).
154. Panchision, DM, Martin-DeLeon, PA, Takeshima, T, Johnston, JM, Shimoda, K, Tsoulfas, P, et al. An immortalized, type-1 astrocyte of mesencephalic origin source of a dopaminergic neurotrophic factor. *J Mol Neurosci* **11**, 209-221. (1998).
155. Petrova, P, Raibekas, A, Pevsner, J, Vigo, N, Anafi, M, Moore, MK, et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* **20**, 173-188. (2003).

156. Lindahl, M, Danilova, T, Palm, E, Lindholm, P, Voikar, V, Hakonen, E, et al. MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic beta cells. *Cell Rep* **7**, 366-375. (2014).
157. Holtz, WA, and O'Malley, KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* **278**, 19367-19377. (2003).
158. Tadimalla, A, Belmont, PJ, Thuerauf, DJ, Glassy, MS, Martindale, JJ, Gude, N, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res* **103**, 1249-1258. (2008).
159. Apostolou, A, Shen, Y, Liang, Y, Luo, J, and Fang, S. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Res* **314**, 2454-2467. (2008).
160. Lindholm, P, Peranen, J, Andressoo, JO, Kalkkinen, N, Kokaia, Z, Lindvall, O, et al. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Mol Cell Neurosci* **39**, 356-371. (2008).
161. Airavaara, M, Shen, H, Kuo, CC, Peranen, J, Saarma, M, Hoffer, B, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J Comp Neurol* **515**, 116-124. (2009).
162. Yu, YQ, Liu, LC, Wang, FC, Liang, Y, Cha, DQ, Zhang, JJ, et al. Induction profile of MANF/ARMET by cerebral ischemia and its implication for neuron protection. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 79-91. (2010).
163. Airavaara, M, Chiocco, MJ, Howard, DB, Zuchowski, KL, Peranen, J, Liu, C, et al. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Exp Neurol* **225**, 104-113. (2010).
164. Shen, Y, Sun, A, Wang, Y, Cha, D, Wang, H, Wang, F, et al. Upregulation of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in glial cells is associated with ischemia-induced glial activation. *J Neuroinflammation* **9**, 254. (2012).
165. Yang, W, Shen, Y, Chen, Y, Chen, L, Wang, L, Wang, H, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor prevents neuron loss via inhibiting ischemia-induced apoptosis. *J Neurol Sci* **344**, 129-138. (2014).
166. Matlik, K, Yu, LY, Eesmaa, A, Hellman, M, Lindholm, P, Peranen, J, et al. Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity. *Cell Death Dis* **6**, e2032. (2015).
167. Wang, XY, Song, MM, Bi, SX, Shen, YJ, Shen, YX, and Yu, YQ. MRI Dynamically Evaluates the Therapeutic Effect of Recombinant Human MANF on Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Int J Mol Sci* **17**(2016).
168. Glembotski, CC, Thuerauf, DJ, Huang, C, Vekich, JA, Gottlieb, RA, and Doroudgar, S. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *J Biol Chem* **287**, 25893-25904. (2012).
169. Zhao, H, Liu, Y, Cheng, L, Liu, B, Zhang, W, Guo, YJ, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits oxygen-glucose deprivation-

- induced cell damage and inflammation by suppressing endoplasmic reticulum stress in rat primary astrocytes. *J Mol Neurosci* **51**, 671-678. (2013).
170. Lindholm, P, Voutilainen, MH, Lauren, J, Peranen, J, Leppanen, VM, Andressoo, JO, et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* **448**, 73-77. (2007).
  171. Zhou, W, Chang, L, Fang, Y, Du, Z, Li, Y, Song, Y, et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor alleviates Abeta25-35-induced endoplasmic reticulum stress and early synaptotoxicity in rat hippocampal cells. *Neurosci Lett* **633**, 40-46. (2016).
  172. Kemppainen, S, Lindholm, P, Galli, E, Lahtinen, HM, Koivisto, H, Hamalainen, E, et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice. *Behav Brain Res* **291**, 1-11. (2015).
  173. Liu, Y, Nie, L, Zhao, H, Zhang, W, Zhang, YQ, Wang, SS, et al. Conserved dopamine neurotrophic factor-transduced mesenchymal stem cells promote axon regeneration and functional recovery of injured sciatic nerve. *PLoS One* **9**, e110993. (2014).
  174. Zhao, H, Cheng, L, Du, X, Hou, Y, Liu, Y, Cui, Z, et al. Transplantation of Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor Transduced BMSCs in Contusion Spinal Cord Injury of Rats: Promotion of Nerve Regeneration by Alleviating Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* **53**, 187-199. (2016).
  175. Cheng, L, Zhao, H, Zhang, W, Liu, B, Liu, Y, Guo, Y, et al. Overexpression of conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) in astrocytes alleviates endoplasmic reticulum stress-induced cell damage and inflammatory cytokine secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **435**, 34-39. (2013).
  176. Matlik, K, Abo-Ramadan, U, Harvey, BK, Arumae, U, and Airavaara, M. AAV-mediated targeting of gene expression to the peri-infarct region in rat cortical stroke model. *J Neurosci Methods* **236**, 107-113. (2014).
  177. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, U, Caglayan, AB, Beker, MC, Kelestemur, T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralateral Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci* **8**, 422. (2014).
  178. Beker, MC, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Caglayan, B, Yalcin, E, Yulug, B, et al. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604-30614. (2015).
  179. Doeppner, TR, Kaltwasser, B, Sanchez-Mendoza, EH, Caglayan, AB, Bahr, M, and Hermann, DM. Lithium-induced neuroprotection in stroke involves increased miR-124 expression, reduced RE1-silencing transcription factor abundance and decreased protein deubiquitination by GSK3beta inhibition-independent pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* **37**, 914-926. (2017).
  180. Hara, H, Harada, K, and Sukamoto, T. Chronological atrophy after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* **618**, 251-260. (1993).
  181. Katchanov, J, Waeber, C, Gertz, K, Gietz, A, Winter, B, Bruck, W, et al. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* **13**, 452-464. (2003).
  182. Pedrono, E, Durukan, A, Strbian, D, Marinkovic, I, Shekhar, S, Pitkonen, M, et al. An optimized mouse model for transient ischemic attack. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 188-195. (2010).

183. Li, H, Zhang, N, Lin, HY, Yu, Y, Cai, QY, Ma, L, et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. *BMC Neurosci* **15**, 58. (2014).
184. Franke, TF, Hornik, CP, Segev, L, Shostak, GA, and Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983-8998. (2003).
185. Hanada, M, Feng, J, and Hemmings, BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1697**, 3-16. (2004).
186. Hao, F, Yang, C, Chen, SS, Wang, YY, Zhou, W, Hao, Q, et al. Long-term protective effects of AAV9-mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor gene transfer in parkinsonian rats. *Exp Neurol* **291**, 120-133. (2017).
187. Gao, X, Zhang, H, Takahashi, T, Hsieh, J, Liao, J, Steinberg, GK, et al. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *J Neurochem* **105**, 943-955. (2008).
188. Zhao, H, Shimohata, T, Wang, JQ, Sun, G, Schaal, DW, Sapolsky, RM, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* **25**, 9794-9806. (2005).
189. Shamloo, M, Rytter, A, and Wieloch, T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* **93**, 81-88. (1999).
190. Noshita, N, Sugawara, T, Hayashi, T, Lewen, A, Omar, G, and Chan, PH. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* **22**, 7923-7930. (2002).
191. Wang, ZQ, Wu, DC, Huang, FP, and Yang, GY. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res* **996**, 55-66. (2004).
192. Shen, CP, Tsimberg, Y, Salvatore, C, and Meller, E. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci* **5**, 36. (2004).
193. Oppenheim, RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501. (1991).
194. Horstmann, S, Kahle, PJ, and Borasio, GD. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival in vitro. *J Neurosci Res* **52**, 483-490. (1998).
195. Skaper, SD, and Walsh, FS. Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci* **12**, 179-193. (1998).
196. Qiu, J, Takagi, Y, Harada, J, Rodrigues, N, Moskowitz, MA, Scadden, DT, et al. Regenerative response in ischemic brain restricted by p21cip1/waf1. *J Exp Med* **199**, 937-945. (2004).
197. Huang, Z, Huang, PL, Panahian, N, Dalkara, T, Fishman, MC, and Moskowitz, MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* **265**, 1883-1885. (1994).
198. Kubes, P, and Granger, DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* **262**, H611-615. (1992).



199. Bolanos, JP, Heales, SJ, Peuchen, S, Barker, JE, Land, JM, and Clark, JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* **21**, 995-1001. (1996).
200. Iadecola, C, Zhang, F, and Xu, X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* **268**, R286-292. (1995).
201. Zhang, F, Casey, RM, Ross, ME, and Iadecola, C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **27**, 317-323. (1996).
202. Liu, T, Clark, RK, McDonnell, PC, Young, PR, White, RF, Barone, FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* **25**, 1481-1488. (1994).
203. Allan, SM, and Rothwell, NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 734-744. (2001).
204. Pang, L, Ye, W, Che, XM, Roessler, BJ, Betz, AL, and Yang, GY. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression. *Stroke* **32**, 544-552. (2001).
205. Lucivero, V, Prontera, M, Mezzapesa, DM, Petruzzellis, M, Sancilio, M, Tinelli, A, et al. Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke. *Neurol Sci* **28**, 165-170. (2007).
206. Montaner, J, Alvarez-Sabin, J, Molina, C, Angles, A, Abilleira, S, Arenillas, J, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* **32**, 1759-1766. (2001).
207. Hayashi, T, Abe, K, Suzuki, H, and Itoyama, Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **28**, 2039-2044. (1997).
208. Kovacs, Z, Ikezaki, K, Samoto, K, Inamura, T, and Fukui, M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* **27**, 1865-1872; discussion 1872-1863. (1996).
209. Liu, HM, and Chen, HH. Correlation between fibroblast growth factor expression and cell proliferation in experimental brain infarct: studied with proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**, 118-126. (1994).
210. Sbarbati, A, Pietra, C, Baldassarri, AM, Guerrini, U, Ziviani, L, Reggiani, A, et al. The microvascular system in ischemic cortical lesions. *Acta Neuropathol* **92**, 56-63. (1996).
211. Hiyama, T, Tanaka, T, Endo, S, Komine, K, Kudo, T, Kobayashi, H, et al. Angiogenesis in atherosclerotic plaque obtained from carotid endarterectomy: association between symptomatology and plaque morphology. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **50**, 1056-1061. (2010).
212. Zheng, XR, Zhang, SS, Yang, YJ, Yin, F, Wang, X, Zhong, L, et al. Adenoviral vector-mediated transduction of VEGF improves neural functional recovery after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Brain Res Bull* **81**, 372-377. (2010).
213. Sun, Y, Jin, K, Childs, JT, Xie, L, Mao, XO, and Greenberg, DA. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1146-1152. (2004).

214. Doherty, P, Fazeli, MS, and Walsh, FS. The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* **26**, 437-446. (1995).
215. Bechmann, I, and Nitsch, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* **20**, 145-154. (1997).
216. Deller, T. The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL). *Anat Embryol (Berl)* **197**, 89-103. (1998).
217. Matthews, DA, Cotman, C, and Lynch, G. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res* **115**, 1-21. (1976).
218. Wang, Y, Ying, GX, Liu, X, Wang, WY, Dong, JH, Ni, ZM, et al. Induction of ephrin-B1 and EphB receptors during denervation-induced plasticity in the adult mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* **21**, 2336-2346. (2005).
219. Overman, JJ, Clarkson, AN, Wanner, IB, Overman, WT, Eckstein, I, Maguire, JL, et al. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2230-2239. (2012).
220. Asher, RA, Morgenstern, DA, Fidler, PS, Adcock, KH, Oohira, A, Braistead, JE, et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* **20**, 2427-2438. (2000).
221. Haas, CA, Rauch, U, Thon, N, Merten, T, and Deller, T. Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci* **19**, 9953-9963. (1999).
222. McKeon, RJ, Schreiber, RC, Rudge, JS, and Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* **11**, 3398-3411. (1991).
223. Asher, RA, Morgenstern, DA, Shearer, MC, Adcock, KH, Pesheva, P, and Fawcett, JW. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* **22**, 2225-2236. (2002).
224. Jones, LL, Margolis, RU, and Tuszynski, MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* **182**, 399-411. (2003).
225. Tang, X, Davies, JE, and Davies, SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* **71**, 427-444. (2003).
226. Seymour, AB, Andrews, EM, Tsai, SY, Markus, TM, Bollnow, MR, Brenneman, MM, et al. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1366-1375. (2005).
227. Wang, L, Zhang, Z, Wang, Y, Zhang, R, and Chopp, M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* **35**, 1732-1737. (2004).

228. Cook, G, Tannahill, D, and Keynes, R. Axon guidance to and from choice points. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 64-72. (1998).
229. Tessier-Lavigne, M, and Goodman, CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133. (1996).
230. Reeves, WB, Kwon, O, and Ramesh, G. Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F731-738. (2008).
231. Wu, TW, Li, WW, and Li, H. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis. *Neuroscience* **156**, 475-482. (2008).
232. Bayat, M, Baluchnejadmojarad, T, Roghani, M, Goshadrou, F, Ronaghi, A, and Mehdizadeh, M. Netrin-1 improves spatial memory and synaptic plasticity impairment following global ischemia in the rat. *Brain Res* **1452**, 185-194. (2012).
233. Carmichael, ST, Wei, L, Rovainen, CM, and Woolsey, TA. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis* **8**, 910-922. (2001).
234. Brown, CE, Li, P, Boyd, JD, Delaney, KR, and Murphy, TH. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci* **27**, 4101-4109. (2007).

EK-1 ETİK KURUL ONAYI



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)  
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
21/03/2014	16		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

<p>“CDNF VE MANF nörotrofik faktörlerinin iskemi sonrası beyin plastisitesi ve onarımı üzerine olan etkileri” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.</p>
<p><b>Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 yıl</b></p>

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	

## EK-2 ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Ahmet Burak	<b>Soyadı</b>	Çağlayan
<b>Doğum Yeri</b>	Mersin	<b>Doğum Tarihi</b>	01.01.1988
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kimlik No</b>	44851234832
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:abcaglayan@medipol.edu.tr">abcaglayan@medipol.edu.tr</a>	<b>Tel</b>	537 229 55 14

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
<b>Yüksek Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi	2013
<b>Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi	2011
<b>Lise</b>	İçel Anadolu Lisesi	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl)</b>
1.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2013 -
2.			
3.			

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi

<b>Yabancı Dil Sınavı Notu</b>								
YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
87,5								

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	79.7	65.6	78.8
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanım becerisi</b>
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi
Adobe Photoshop	Orta

## Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

### Uluslararası Yayınlar

1. Kilic U, **Caglayan AB**, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Yulug B, Yilmaz B, Kerman BE, Kilic E. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biol.* 2017 Aug;12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006. Epub 2017 Apr 5.
2. Caglayan B, **Caglayan AB**, Beker MC, Yalcin E, Beker M, Kelestemur T, Sertel E, Ozturk G, Kilic U, Sahin F, Kilic E. Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol.* 2017 Jun 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.
3. Demirci S, Doğan A, Başak Türkmen N, Telci D, **Çağlayan AB**, Beker MÇ, Kiliç E, Özkan F, Dede B, Şahin F. Poloxamer P85 increases anticancer activity of Schiff base against prostate cancer in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs.* 2017 Jun 13. doi: 10.1097/CAD.0000000000000528.
4. Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, **Caglayan AB**, Turkseven S, Gurel B, Kelestemur T, Sertel E, Sahin Z, Kutlu S, Kilic U, Baykal AT, Kilic E. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol.* 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4.
5. Doeppner TR, Kaltwasser B, Sanchez-Mendoza EH, **Caglayan AB**, Bähr M, Hermann DM. Lithium-induced neuroprotection in stroke involves increased miR-124 expression, reduced RE1-silencing transcription factor abundance and decreased protein deubiquitination by GSK3 $\beta$  inhibition-independent pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Mar;37(3):914-926. doi: 10.1177/0271678X16647738.
6. Eren Z, Gunal MY, Ari E, Coban J, Cakalagaoglu F, **Caglayan AB**, Beker MC, Akdeniz T, Yanikkaya G, Kilic E, Kantarci G. Pleiotropic and Renoprotective

- Effects of Erythropoietin Beta on Experimental Diabetic Nephropathy Model. *Nephron*. 2016 132:292-300. doi: 10.1159/000444649.
7. Doğan A, Demirci S, Türkmen NB, **Çağlayan AB**, Aydın S, Telci D, Kılıç E, Şahin K, Orhan C, Tuzcu M, Ekici AI, Şahin F. Schiff Base-Poloxamer P85 Combination Prevents Prostate Cancer Progression in C57/Bl6 Mice. *Prostate*. 2016 Nov;76(15):1454-63. doi: 10.1002/pros.23229.
  8. Kartal Ö, Aydınöz S, Kartal AT, Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Karademir F, Süleymanoğlu S, Kul M, Yulug B, Kilic E. Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Metab Brain Dis*. 2016 Aug;31(4):827-35. doi: 10.1007/s11011-016-9816-z.
  9. Kelestemur T, Yulug B, **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neurosci Lett*. 2016 Jan 26;612:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.043.
  10. Hermann DM, Zechariah A, Kaltwasser B, Bosche B, **Caglayan AB**, Kilic E, Doeppner TR. Sustained neurological recovery induced by resveratrol is associated with angiogenesis rather than neuroprotection after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2015 Nov;83:16-25. doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.018.
  11. Beker MC, **Caglayan AB**, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30604-14. doi: 10.18632/oncotarget.5773.
  12. Seker FB, Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu MS, **Caglayan AB**, Ekinci N, Demirci S, Dogan A, Oztezcan S, Sahin F, Yilmaz B, Kilic E. HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via mechanisms involving eNOS. *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:349-59. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.014.
  13. Kilic E, Reitmeir R, Kilic Ü, **Caglayan AB**, Beker MC, Kelestemur T, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and

Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2014 Dec 11;8:422. doi: 10.3389/fncel.2014.00422.

14. Doğan A, Demirci S, **Cağlayan AB**, Kılıç E, Günal MY, Uslu U, Cumbul A, Sahin F. Sodium pentaborate pentahydrate and pluronic containing hydrogel increases cutaneous wound healing in vitro and in vivo. *Biol Trace Elem Res.* 2014 Dec;162(1-3):72-9. doi: 10.1007/s12011-014-0104-7.
15. Sonay AY, **Caglayan AB**, Culha M. Synthesis of Peptide Mediated Au Core–Ag Shell Nanoparticles as Surface-Enhanced Raman Scattering Labels. *Plasmonics.* 2012 7:77-86. doi: 10.1007/s11468-011-9278-4.

### **Uluslararası Bildiriler**

1. Poster- Beker MC, **Caglayan AB**, Yalcin E, Kilic U, Baykal AT, Gurel B, Kilic E, “Proteomic Approach To Circadian Rhythm After Brain Injury”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
2. Poster- **Caglayan AB**, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Sarma M, Kilic E, “The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
3. Poster- Caglayan B, **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic U, Yalcin E, Altunay S, Kelestemur T, Gunal MY, Hanoglu L, Yulug B, Kilic E, “Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neuronal survival in the acute phase and stroke- recovery in the sub-acute phase of focal cerebral ischemia” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
4. Poster- Kilic U, **Caglayan AB**, Beker MC, Elibol B, Beker M, Altug-Tasa B, Ozcicek I, Ozen M, Yilmaz B, Kilic E, “Melatonin Promotes Stroke Recovery By Stimulating Axonal Projections And Neurogenesis”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.
5. Poster- Yalcin E, **Caglayan AB**, Beker MC, Gurel B, Kelestemur T, Caglayan B, Dalay A, Dilden A, Altunay S, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, “Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.



6. Poster- Kilic U, Beker MC, **Caglayan AB**, Elibol B, Karakas M, Altug B, Gok O, Kelestemur T, Kilic E, “Melatonin promotes neurological recovery, perilesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
7. Poster- Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic U, Altunay S, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E, “Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
8. Poster- **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Ozturk G, Kilic E “The role of neuronal expression of P2X7 receptors in the processes of brain injury in mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
9. Poster- Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Inhibition but not activation of P2X7 receptors improves brain epileptiform activity in mice: Role of iNOS activation” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
10. Poster- Beker MC, **Caglayan AB**, Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E, “Roles of oxygen treatment in the development of ischemic brain injury, signal transduction and brain microcirculation after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
11. Poster- Kilic U, **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic E “The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates melatonin’s neuroprotective activity after focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.
12. Poster- **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, Gundogdu RZ, Kilic E “Roles of P2X7 receptors in neuronal injury after optic nerve transection and focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.

#### **Ulusal Bildiriler ve Sözlü Sunumlar**

1. Sözlü Sunum- Beker MC, **Caglayan AB**, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Dalay A, Altunay A, Sertel E, Kilic E, “Effects of Circadian Rhythm on

- Brain Injury and Related Molecular Mechanisms” 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 20/32, Düzce, 2016.
2. Sözlü Sunum- Kelestemur T, Beker MC, **Caglayan AB**, Yalcin E, Altunay S, Dalay A, Sertel E, Dilden A, Caglayan B, Kilic E, “Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia –Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, OC23, Düzce/ Turkey, 2016.
  3. Poster- Yalcin E, **Caglayan AB**, Beker MC, Kelestemur T, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kilic E, “The role of solute carrier Oatp1a4 in brain injury pharmacotherapy” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress ,PC108, Düzce/Turkey, 2016.
  4. Poster- Kilic U, Elibol B, Beker MC, **Caglayan AB**, Tasa-Altug B, Beker M, Ozen B, Yilmaz B, Kilic E, “Plasticity-Promoting Effect of Melatonin After Experimental Cerebral Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC112, Düzce/Turkey, 2016.
  5. Poster- **Caglayan AB**, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Kelestemur T, Yalcin E, Kilic U, Saarma M, Kilic E, “Effect of Neurotrophic factors CDNF and MANF Brain Plasticity and Repair After Brain Ischemia” Turkish Society ofPhysiological Sciences 42nd National Physiology Congress, PC118, Düzce/ Turkey, 2016
  6. Sözlü Sunum- **Caglayan AB**, Yalcin E, Beker MC, Caglayan B, Kelestemur T, Ozturk G, Kilic E “In vivo ve in vitro P2X7 reseptörü aracılı nöronal sağkalım mekanizması” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
  7. Poster- Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
  8. Poster- Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Yalcin E, Caglayan B, Kilic E “Melatonin ve normobarik oksijen tedavisinin reperfüzyon hasarına etkileri” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
  9. Poster- Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptör baskılanması ve aktivasyonunun beyin epileptiform aktivitesi,

- mikrodolaşımı ve hücre içi sinyal iletim molekülleri üzerine olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
10. Poster- Beker MC, **Caglayan AB**, Kelestemur T, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Normobarik oksijen tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar, sinyal mekanizmaları ve beyin kan dolaşımına olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014
  11. Sözlü sunum- Kilic U, Gok O, Karakas M, Elibol B, Beker MC, **Caglayan AB**, Kilic E “İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmeyi sağlayan plastisiteye bağlı moleküler mekanizmalarda melatoninin etkinliğinin araştırılması” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.
  12. Sözlü sunum- Kelestemur T, **Caglayan AB**, Beker MC, Yilmaz B, Kilic E “Sıçanlarda memantin ve melatonin tedavisinin travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin araştırılması” 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2013.
  13. Poster- **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic E, Kilic U “P2X7 reseptörlerinin fare optik kesisi ve fokal iskemi modelleriyle oluşturulan nöronal hasar üzerine etkisi” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.
  14. Poster- Kilic U, **Caglayan AB**, Beker MC, Kilic E “Fosfatidil inozitol-3 kinaz/AKT sinyal yolağının Melatoninin iskemi sonrası nöroprotektif etkisinde rolü” 13. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013.
  15. Sözlü sunum- Seker FB, Kilic U, **Caglayan AB**, Ekimci N, Cevreli B, Beker MC, Demirci S, Dogan A, Yilmaz B, Kilic E “Profiklaktik olarak uygulanan 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Redüktaz İnhibitörlerinin penisilinle indüklenen beyin epileptik aktivitesine etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.
  16. Sözlü-sunum- Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu, **Caglayan AB**, Beker MC, Ekimci N, Kilic E “3-Hydroxy-Methykgkutaryl Coenzyme A reductase inhibitörü rosuvastatinin beyin felci sonrası beyin plastisitesi ve onarım üzerine olan etkileri” TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2012.

## **Sertifikalar**

1. Deneysel hayvanlar kullanım sertifikası
2. İstanbul Gönüllü İtfaiyeci sertifikası

## **Ödüller**

1. Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu (EMBO), The 7th EMBO Katılım Desteği
2. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Poster Birincilik Ödülü
3. Moleküler Biyoloji Derneği, The 5th EMBO Katılım Desteği
4. TÜBİTAK 2209 – Üniversite Öğrencileri Yurt içi Araştırma Projeleri Destekleme Programı “Bitki hücrelerinde ekzozomların varlığının RAMAN spektroskopisi ile gösterilmesi”