



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BEYİN FELCİ SONRASI MEYDANA GELEN PLASTİSİTE İLE
İLGİLİ PATOFİZYOLOJİK SÜREÇLERİN İLERİ
MİKROSKOPİ TEKNİKLERİYLE İNCELENMESİ**

TAHA KELEŞTEMUR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2017

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi

Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)

Anabilim Dalı : Sinirbilim

Tez Sahibi : Taha KELEŞTEMUR

Tez Başlığı : Beyin Felci Sonrası Meydana Gelen Plastisite ile İlgili Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopi Teknikleriyle İncelenmesi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi

Sınav Tarihi : 09.08.2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Prof.Dr. Ümmühan İŞOĞLU ALKAÇ

İstanbul Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Bilal Ersen KERMAN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..15../.08../.2017. tarih ve ..2017.../..24... - ..25... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması için elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Taha Keleştemur

TEŞEKKÜR

Gerek yüksek lisans gerekse doktora eğitimim boyunca bilimsel bakış açımın gelişmesinde büyük rol oynayan, yaşam ile ilgili olaylara karşı bakış açımı değiştiren, her zaman her konuda yanımda olan hiçbir zaman desteğini esirgemeyen hem ağabeyim hem hocam Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a,

Doktora eğitimime başladığım günden beri beni her konuda destekleyen, birçok kişinin ulaşamayacağı alt yapıyı bizlere sunan gerek yurt içinde gerekse yurt dışında farklı laboratuvarları tanımam ve eğitim almam için beni destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e

Özellikle viral vektör çalışmalarında ki teknik desteğinden dolayı ve yurt dışı üniversite ziyaretlerimdeki katkılarından dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY'a

Yedi yıldır beraber çalıştığım, her konuda benden yardımlarını esirgemeyen kardeşim gibi sevdiğim Ahmet Burak ÇAĞLAYAN ve Mustafa Çağlar BEKER'e

Ayrıca çalışmalarım da yardımcı olan Berrak Çağlayan ve Esra YALÇIN'a ve laboratuvarımızın değerli asistanları Serdar ALTUNAY, Arman DALAY, Aysun DİLDEN, Reyda KARAÇAY ve Elif SERTEL'e,

Deney hayvanları birimi çalışanlarından Ali ŞENBAHÇE ve Ekrem ÖZDEMİR'e

Uzun yıllardır kardeşim gibi sevdiğim laboratuvarımızın sorumlularından Kaan ALKAN'a,

Ve tabii ki altı senedir benim her türlü kahrımı çeken manevi olarak en büyük destekçim, hayat arkadaşım değerli eşim Seda KELEŞTEMUR'a ve koca oğlum Attila Sadri KELEŞTEMUR'a en kalbi dileklerimle teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmamı hayatta kendime örnek almaya çalıştığım, akademik hayata başlamamda en büyük etken olan, kendisini sadece milli değerlere adayan babam Sayın Prof. Dr. Fahrettin KELEŞTEMUR'a ve sevgili annem Fazilet KELEŞTEMUR'a ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Beyin felci	4
4.2. Beyin felci patofizyolojisi.....	4
4.3. Plastisite ve beyin felci	5
4.4. Beyin felcinde sinaptik fonksiyon bozukluğunun patomekanizması.....	7
4.5. Beyin felci sonrası plastisitenin hücrel ve moleküler substratları	8
4.6. İskemide peri-infarkt aksonal filizlenme	11
4.7. İskemi sonrası kontralateral kortikal aksonal filizlenme	12
4.8. İleri mikroskop teknikleri ve şeffaflaştırma.....	13
4.8.1. Nöron izleme ve yeniden yapılandırma	13
4.8.2. Şeffaflaştırma	16

4.8.2.1.	Solvent bazlı şeffaflaştırma.....	16
4.8.2.2.	Hidrojele gömme	16
4.8.3.	Şeffaflaştırılmış dokunun görüntülenmesi.....	17
4.8.4.	Konfokal ve 2-foton mikroskopta çalışma mesafesi: şeffaflaştırılmamış doku.....	17
4.8.5.	Konfokal ve 2-foton mikroskopta çalışma mesafesi: şeffaflaştırılmış doku	18
4.8.6.	Konfokal ve 2-foton.....	19
4.8.7.	Işık perdeli mikroskop ile görüntüleme	19
5.	MATERYAL VE METOT.....	21
5.1.	Orta serebral arter oklüzyon modeli ve beyin kan akımı ölçümü.....	21
5.2.	Virüs hazırlama.....	22
5.2.1.	AAV üretimi	22
5.2.1.1.	Transformasyon	22
5.2.1.2.	Transfeksiyon.....	22
5.2.1.3.	Pürifikasyon	22
5.2.1.4.	Virüs enjeksiyonu	23
5.3.	Kullanılan şeffaflaştırma yöntemleri ve optimizasyon	25
5.3.1.	Clarity yöntemi ile şeffaflaştırma	25
5.3.2.	3Disco yöntemi ile şeffaflaştırma	26
5.4.	Görüntüleme	27
5.4.1.	Axio zoom mikroskop.....	27
5.4.2.	Lazer taramalı konfokal mikroskop	27
5.4.3.	2-foton mikroskop.....	28
5.4.4.	Işık perdeli floresan mikroskop	28

5.5. İstatistik.....	28
6. BULGULAR.....	29
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
8. KAYNAKLAR	49
9. ETİK KURUL ONAYI.....	61
10. ÖZGEÇMİŞ	63



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AAV	adeno asosiye virüs
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
AQP	Aquaporin
ATP	Adenozin trifosfat
AZM	Axio Zoom Mikroskop
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
DBE	Di benzil eter
DNA	Deoksiribo nükleik asit
fMRI	fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme
FN	Fasiyal nükleus
GABA	Gamma-amobütirik asit
GFP	green floresan protein
HRP	Yaban turpu peroksidaz
IPFM	Işık perdeli floresan mikroskop
KBB	Kan beyin bariyeri
LDF	Lazer dopler akımı
LTKM	Lazer taramalı konfokal mikroskop
MEG	Magnetoensefelografi
MFM	Multi foton mikroskop
MİP	Maksimum intensity projeksiyon
MSS	Merkezi sinir sistemi
NA	Diyafram açıklığı
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PET	Positron emission tomografi
PFA	Parafolmaldehid
PNA	Perinöronal ağ
RN	Red nükleus
SDS	sodyum dodesil sülfat
THF	Tetrahidrofur
TMU	Transkraniyal manyetik uyarım
TTÇ	Tamponlu tuz çözeltisi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 6.1 Deney dizaynı	21
Şekil 6.2.1. Virüs hazırlama basamakları	23
Şekil 6.2.1.4.1. Viral enjeksiyon bölgeleri	24
Şekil 6.2.1.4.2. Beyin Kesitlerinde RN ve FN konumları	25
Şekil 6.1. Karşı hemisfere geçen akson sayıları	41



TABLO LİSTESİ

Tablo 5.3.2.1. 3DISCO şeffaflaştırma protokolü.....	27
--	----



RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.1. Bütün beyin dokusunda farklı şeffaflaştırma yöntemleri.....	29
Resim 6.2. Transgenik GFP-M hayvanda 2-PM ve LTM görüntüleri	30
Resim 6.3. Tg GFP-M hayvanda şeffaflaşmış hipokampus bölgesi	31
Resim 6.4. Hücre kültürü AAV görüntüleri	32
Resim 6.5. Enjeksiyon bölgeleri in vivo	32
Resim 6.6. Virüs enjeksiyon bölgelerinin dorsal görünümü	33
Resim 6.7. Virüs enjeksiyon bölgelerinin ventral görünümü.....	34
Resim 6.8. Viral vektörlerin enjeksiyonunun ardından serebellumun ventral görünümü tdTOMATO	35
Resim 6.9. Viral vektörlerin enjeksiyonunun ardından serebellumun ventral görünümü GFP.....	35
Resim 6.10. Viral optimizasyon görüntüleri	36
Resim 6.11. İskemi geçirmeyen hayvanda FN bölgesi aksonal projeksiyonları	37
Resim 6.12. RN bölgesindeki aksonal projeksiyonlar.....	38
Resim 6.13. İskemi geçiren hayvanların RN bölgesindeki aksonal projeksiyonları .	39
Resim 6.14. İskemik hayvanda FN bölgesindeki görüntüleri	40
Resim 6.15. IPFM ile alınan hasar bölgesi.....	42
Resim 6.16. IPFM ile alınan hasar bölgesi, RN ve FN bölgeleri	43
Resim 6.17. IPFM ile alınan 3 boyutlu beyin görüntüsü.....	44

1. ÖZET

BEYİN FELCİ SONRASI MEYDANA GELEN PLASTİSİTE İLE İLGİLİ PATOFİZYOLOJİK SÜREÇLERİN İLERİ MİKROSKOPİ TEKNİKLERİYLE İNCELENMESİ

Beyin felci insanlarda en fazla motor fonksiyon bozukluklarına neden olan hastalıktır. Beyin felci sonrası post-iskemik fazda beynin endojen onarım mekanizmalarının etkinleştirilerek fonksiyonel olarak iyileşmesi, rehabilitasyon ve beyin plastisitesini uyaran tedaviler ile mümkün olabilmektedir. Post-iskemik fazda beyin felcinin iyileşmesi, kortikal ve subkortikal seviyede nöronal ağın yeniden organize edilmesiyle gerçekleşmektedir. Böylece fonksiyonel olmayan nöronal ağ, aktive edilip yeni bağlantılar ile güçlendirilerek hasarlı bölge çevresi ve beynin farklı bölgeleri ile iletişimi sağlanmaktadır. Beyin felci sonrasında hasarlı dokunun yeniden şekillendirilmesinde iskemik olmayan hemisferde (kontralateral) aksonal yapılanma (projeksiyon) gibi değişiklikler beynin, iskemik beyin felci sonrası oluşan yeni duruma hazırlanmasına ve fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunmaktadır. Daha önce bu konu ile ilgili yapılmış olan deneysel çalışmalar ipsilateral ve kontralateral hemisferlerde bu süreçlerin birbirinden bağımsız olarak geliştiğini göstermektedir. Ayrıca bu süreçlerin nasıl koordine edildiğine dair bilgiler yetersiz kalmaktadır. Bu tezin amacı kapsamında farelerde 30 dakikalık beyin felci uygulamasını takiben akut patofizyolojik değişikliklerin tamamlandığı 3. günde sinaptik reorganizasyonların ve projeksiyonların üç boyutlu olarak belirlenmesi için hayvanların motor kortekslerine yeşil floresan ve kırmızı floresan ifade eden viral vektör enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyondan sonra 30. günde hayvanlar kurban edilip beyinleri çıkartılarak 1 mm'lik bloklar halinde veya bütün beyin dokusu şeffaflaştırılıp, lazer taramalı konfokal mikroskop, multi foton mikroskop ve ışık perdeli mikroskop kullanılarak görüntülenerek hasar sonrası meydana gelen aksonal projeksiyonların 3 boyutlu haritalandırılması yapıldı. Sonuç olarak, şeffaflaştırma tekniğinin kullanılması ve bunun yanında viral vektör enjeksiyonlarının yapılması beyin felci patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, hasardan sonra meydana gelen plastisitenin kortiko spinal yolların daha iyi belirlenmesi ve son olarak geliştirilecek tedavi yöntemlerinin etkinliklerinin yorumlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin felci, plastisite, aksonal projeksiyon, şeffaflaştırma

2. ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF PLASTICITY RELATED PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES AFTER CEREBRAL ISCHEMIA USING ADVANCE MICROSCOPY TECHNIQUES

Brain ischemia, is the leading cause of motor dysfunctions in humans. During the post-ischemic phase after brain ischemia, activation of endogenous repair mechanisms and functional recovery in the brain are achieved by the treatments promoting brain plasticity. Recovery from brain ischemia in the post-ischemic phase is achieved by the reorganization of neuronal networks in the cortical and subcortical levels. Thus, dysfunctional neuronal network is activated and enhanced by the new connections to promote the interaction between the peri-infarct zone and the different areas of the brain. In the process of remodeling of the injured tissue following brain ischemia, alterations such as axonal structuring in the non-ischemic hemisphere (contralateral) contributes to the adaptation of the brain to this new condition and to functional recovery. Previous experimental studies have shown that these processes develop independently from each other in the ipsilateral and contralateral hemispheres. Moreover, there is not enough information on how these processes are coordinated. In the scope of this thesis, to determine the 3D synaptic reorganization and projections, green and red fluorescent protein expressing viral vectors were injected at the 3rd day (when the acute pathophysiological alterations are completed) following 30 min brain ischemia in mice. Animals were sacrificed 30 days after the injection, brains were removed, 1 mm blocks of or whole brain tissue was cleared and the tissue was imaged using laser scanning confocal microscopy, multiphoton or lightsheet microscopy. Then, the axonal projections occurred after the injury was 3D mapped. In conclusion, it is believed that use of clearing technique as well as viral vector injections will help clarifying the pathophysiology of brain ischemia, identifying the corticospinal pathways of the plasticity after injury and finally interpreting the efficacy of future treatment methods.

Keywords: Brain ischemia, plasticity, axonal projection, clearing

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya çapında her yıl 15 milyon kişi beyin felci geçirmekte, bunların 5 milyonu kalıcı sakatlıklar yaşarken yaklaşık 5 milyonu da yaşamını kaybetmektedir. Beyin patofizyolojisi ve anatomisi oldukça kompleks yapılardan oluşmaktadır. Bu tez çalışması ile beyin felci sonrası plastisitenin daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konması, yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ve değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada deneysel beyin felci sonrası plastisite gelişimindeki değişikliklerin ileri görüntüleme teknikleri kullanılarak araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç için fareler beyin felci uygulandıktan sonra aksonal projeksiyondaki değişikliklerin incelenmesi amacıyla motor kortekse verilen viral vektör enjeksiyonları ile motor korteks hücreleri hedeflenerek aksonların görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Hücre somasından akson boyunca ilerleyen viral yeşil floresan (GFP) ve kırmızı floresan (tdTomato) proteinlerinin hemisferler arası geçişleri takip edilerek 3 boyutlu olarak beyin felci sonrası aksonal projeksiyondaki değişikliklerin ortaya konması sağlanmıştır. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalardan yola çıkılarak Fasiyal nukleus (FN) ve Red nukleus (RN) bölgeleri beyinde plastisite ile ilgili değerlendirme alanları olup herhangi bir hasar durumunda hasarsız kısımdan (kontralateral), hasarlı alana (ipsilateral) doğru akson geçişleri meydana gelmektedir. Doku şeffaflaştırma ve sonraki görüntüleme, floresan işaretli hücrelerin ve moleküllerin 3 boyutlu olarak analiz edilmesinde en etkin yöntemlerden biridir. Klasik histolojik uygulamalar sonrasında kalın ve opak bir dokuda mikroskop altında görüntü alınırken lazer taramalı mikroskoplarda en fazla 20-50 µm derinliğe inilebilmektedir. Şeffaflaştırma yöntemleri kullanılarak gerek bütün beyin dokusu gerekse diğer organlarda lazer geçirgenliği artırılıp dokuda daha derin bölgelerden görüntü alınabilmektedir. Bu nedenlerle bu çalışmada ileri görüntüleme tekniklerinin etkin kullanılması amacıyla şeffaflaştırma tekniği kullanılmıştır. Bu çalışma (i) yeni tekniklerin beyin felci patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması amacıyla kullanılması, (ii) hasar sonrası meydana gelen plastisitenin yolaklarının daha iyi belirlenmesi, (iii) elde edilen bu bulguların gelecekte geliştirilecek olan tedavi yöntemlerinin etkinliklerinin yorumlanmasına katkı sağlaması hedeflenen güncel ileri tekniklerin kullanıldığı bir çalışmadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beyin felci

Beyin felci yetişkin dönemdeki üçüncü sıradaki ölüm nedeni olmasına rağmen ilk sıradaki morbidite nedenidir. Serebral iskemi nöronal kayıp, bilişsel işlev bozukluğu ve sinaptik disfonksiyon, bilişsel gerileme ve bellek zayıflamasına neden olabilmektedir [1-7]. Her yıl beyin felci sebebiyle yaklaşık 800,000 kişi fizyolojik olarak gelişen beyin plastisitesi ile yaşantılarına devam edebilmektedirler. Ancak büyük bir kısmı, üretim kaybı, özgürlüklerinin kısıtlanması ve sosyal olarak kendilerini toplumdan izole etmektedirler [8]. Her ne kadar rekombinant doku plazminojen aktivatörü veya cerrahi işlemlerle tıkanan damarın açılması sağlanabilse de bu tedavi seçenekleri ancak damarın tıkanmasını takiben 3-4 saatlik dilimde uygulanabilmektedir. Bununla beraber beyin felci sonrası bakım düzeyinin iyileştirilmesi ve fizyoterapi tekniklerinin geliştirilmesine paralel olarak tedavi yaklaşımlarda gün geçtikte gelişmektedir ve bu da yaşam süresini pozitif yönde etkilemektedir. Ancak hayatta kalanların büyük bir çoğunluğu beyinde meydana gelen hasarın bulunduğu bölgenin işlev kaybına yansıması ile beraber yaşamak zorunda kalmaktadır.

4.2. Beyin felci patofizyolojisi

Patofizyolojik açıdan değerlendirildiğinde beyin felcini takiben oluşan hasar kompleks süreçler sonrasında meydana gelmektedir. Lokal beyin hasarı sonrasında hasarlı bölge patofizyolojik açıdan iki kısma ayrılmaktadır. Hasarlı bölgenin orta kısmı kor bölgesini oluşturur. Bu bölgede nekrotik hücre ölümü baskındır, hasarlı bölgenin perifer kısmını oluşturan bölge penumbra olarak adlandırılır ve nispeten kan akımı kor bölgesine göre daha iyi durumda olup özellikle apoptotik hücre ölümü gözlemlenmektedir [9]. Beyin dokusunda diğer dokular ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde oksijen ve glikoz kullanımı söz konusu olup enerji üretimi hemen hemen tamamıyla oksidatif fosforilasyona bağlıdır. Beyin felcinin akut fazında beynin belli bir bölgesine gelen kan akımının durması sonrasında oluşan enerji eksikliği nöronların membran polarizasyonlarını kaybederek depolarize olmalarına ve içerdikleri uyarıcı glutamat nörotransmitterleri sinaptik boşluk ve ekstrasellüler boşluğa vermelerine neden olmaktadır. Aynı zamanda yine enerji eksikliği nedeniyle glutamat geri alım mekanizmalarının da işlevlerini kaybetmeleri hücrelerarası boşlukta aşırı miktarda

glutamat nörotransmitter birikimine neden olmaktadır. Bu olay beyin felci patofizyolojisinde glutamat nörotoksisitesi (*excitotoxicity*) olarak adlandırılmaktadır [10]. Postsinaptik nöronların glutamat ile uyarılması sonrasında hücre içersine Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının girişi bu nöronların depolarize olarak ekstrasellüler sıvıya tekrar glutamat nörotransmitterlerinin ve K^+ iyonlarının salınımına neden olmaktadır. Bu beyin felcinin olduğu alandan periferde doğru dalga şeklinde yayılan uyarılmalara “hasar çevresi depolarizasyon (peri-infarct depolarization)” neden olmakta ve hasarın periferindeki nöronların enerji ihtiyaçlarını artırarak ölümlerine neden olabilmektedir. Bu uyarı dalgalarının beyin felci sonrası oluşan hasarın yaklaşık %20’sinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir [11]. Hücre içine uyarılma sonrası giren Na^+ ’u, Cl^- ve su izleyerek hücrede “sitotoksik hücresel ödem” oluşumuna neden olmaktadır. Genel sinyal iletilici olarak da adlandırılan ve glutamat nörotoksisitesi sonrası hücre içinde aşırı artan Ca^{+2} ’un aktive ettiği enzimler bir taraftan membran yıkımına neden olurken diğer taraftan serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Devam eden süreçte ise yangının uyarılması sonrasında lökosit infiltrasyonu ve mikrogliya aktivasyonu gözlenmektedir [12]. Bunu takiben, Ca^{+2} ve serbest radikaller DNA ve mitokondri hasarı üzerinden apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır [9].

4.3. Plastisite ve beyin felci

Beyin plastisite terimi, bir bireyin tüm ömrü boyunca merkezi sinir sisteminde meydana gelen sinirsel bileşenlerin organizasyonundaki tüm değişiklikler olarak tanımlanır [13]. Plastisite ile ilgili mekanizmalar: hasara uğramış fonksiyonların iyileştirilmesi için paralel yolların aktivasyonu; nöronal ağın yeniden organize edilmesi ve yeni bağlantıların oluşmasını sağlayan sinaptogenez ve sessiz kalan yolların (*silent pathways*) aktivasyonudur [14]. Anjiyogenez, nörogenez ve sinaptogenez iskemik beyin felcinin iyileşmesinde birbiriyle ilişkili olan onarım mekanizmalarıdır. İskemik ortamın periventriküler bölgelerde ve serebral korteksde yeni nöronların oluşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir [15, 16]. Serebral iskeminin ardından iyileşme kompleks ve dinamik bir olaydır [17]. Sinaptik plastisite, serebral hasarı takiben fonksiyonel iyileşme ve davranış değişiklikleri ile de ilişkilidir [18]. Dendritik dallanma ve diken (*spine*) yoğunluğunun artırılması beyindeki nöronal ağın reorganizasyonunun sağlanması için potansiyel morfolojik stratejilerdir [19]. Bu süreç uzun vadede gerçekleştiği ve regülasyon mekanizması bilinmediği için etkili farmakolojik tedavilere yönelik yeni stratejiler geliştirilmelidir. İskemik beyin felci

sonrası, sinaptik aktivitenin iskemik lezyon sınırında arttığı sinaptik protein ekspresyonu ve ilgili büyüme faktörlerinin artışı ile kanıtlanmıştır [20].

Statinler gibi farmakolojik ajanlar [21-23], eritropoietin [24, 25], trofik faktörler ve büyüme faktörleri tamir mekanizmalarının bir ve birkaçını birlikte uyararak beyin felci sonrası fonksiyonel iyileşmeyi arttırabilirler. Bunlar nöroenez [26-28], anjiogenez [24, 29], sinaptogenez [30, 31], seviyesinde önemli değişiklikler yapan sinyal iletimi üzerinden etki gösterir. Beyin felci insanlarda en fazla motor fonksiyon bozukluklarına neden olan hastalıktır [32]. Beyin felcinin akut fazında hastaların %80-90'ında hemiparezis görülmesine rağmen bu hastaların %40-60'ında post-akut fazda motor fonksiyon bozuklukları görülmeye devam etmektedir. Bu durum nörolojik iyileşmenin kısıtlı olduğunu göstermektedir. Beyin felci sonrası post-iskemik fazda beynin endojen onarım mekanizmalarının etkinleştirilerek en azından fonksiyonel olarak iyileşmesi, rehabilitasyon [33] ve beyin plastisitesini uyaran tedaviler ile paralellik göstermektedir [34, 35]. Post-iskemik fazda beyin felcinin iyileşmesi, kortikal ve subkortikal seviyede nöronal ağın yeniden organize edilmesiyle gerçekleşmektedir. Yedek veya fonksiyonel olmayan nöronal ağ, aktive edilip yeni bağlantılar ile güçlendirilerek hasarlı bölge çevresi ve beynin farklı bölgeleri ile iletişimi sağlanmaktadır. Beyin felci sonrasında hasarlı dokunun yeniden şekillendirilmesinde iyileşme ile paralellik gösterdiği klinik çalışmalardan bilinen damarlaşma (anjiogenez), astrogliozun engellenmesi ve anti-inflamatuvar etki rol oynamaktadır. İskemik hemisferdeki bu süreçlerin yanında iskemik olmayan hemisferde de damarlaşmada artış ve aksonal yapılanma (sprouting) gibi değişiklikler beynin beyin felci sonrası oluşan yeni duruma hazırlanmasına katkıda bulunmaktadır [34, 36]. Daha önce bu konu ile ilgili yapılmış olan deneysel çalışmalar beyin felcinin olduğu ipsilateral ve olmadığı kontralateral hemisferlerde bu süreçlerin birbirinden bağımsız olarak geliştiğini göstermektedir. Bu süreçlerin nasıl koordine edildiğine dair hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber kontralateral beyin hemisferinin bu süreçlere katılmasının iyileşme sürecini pozitif etkilediği deneysel çalışmalardan bilinmektedir [34, 36]. Bu çalışmalarda, kontralateral motor kortekse anterograd tracer enjeksiyonu metoduyla elde edilen bulgular plastisiteyi uyaran tedavilerin kontralateral projeksiyonları artırarak nörolojik iyileşmeyi uyardığını göstermektedir. Bununla beraber, yapılan bu çalışmalarda motor korteksin hasarıyla sonuçlanan kalıcı beyin felci modeli kullanılmış ve ipsilateral hemisferdeki projeksiyonlar

değerlendirilmemiştir. Buna ilaveten, insanlarda yapılan pozitron emission tomografi (PET), fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI), transkraniyal manyetik uyartım (TMU) ve magnetoensefelografi (MEG) çalışmaları ile kontralateral hemisferdeki plastisitenin beyin felci sonrası iyileşme ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir [35, 37-39]. İnsanlarda bu sonuçların yorumlanması oluşan beyin felcinin homojenlik göstermemesi nedeniyle güç olmaktadır.

5. Beyin felcinde sinaptik fonksiyon bozukluğunun patomekanizması

Sinapslar, sinir hücreleri arasındaki özelleşmiş hücreden hücreye bağlantı bölgeleridir ve sinir sisteminde kimyasal nörotransmisyonunda yer alan esas yapıyı oluşturmaktadırlar ve pre- ve postsinaptik sistem ile etrafını çevreleyen astroglial kaplamayı içeren üç önemli bileşenden oluşmaktadırlar. Sinaptik plastisite terimi, kullanıma bağlı sinaptik değişkenliklerin farklı birçok konusunu kapsamakta ve sinaptik sinyal olaylarıyla alakalı sinapsın moleküler yapısındaki yapısal değişikliklerin yanı sıra sinaptik sinyal iletimi kavramlarını da açıklayan daha geniş bir alanı içermektedir. İskemi gibi tedaviye kolay cevap vermeyen nörolojik koşullar, sinaptik fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanan sinaptik sinyal iletiminde ve yapısında hasara neden olabilir [40]. Akut iskemik beyin felci, beyine kan taşıyan bir arter tıkanığında oluşmakta ve kan beyin bariyerinde (KBB) hasar, beyin ödemi, nöronal hücre ölümü ve beyinde sinaptik kayıp gibi çeşitli patofizyolojik değişikliklere neden olmaktadır [41].

Aquaporin (AQP) hücre membranından su taşınmasını kolaylaştıran bir su kanalı proteindir [41]. Spesifik olarak AQP-1 sadece suya geçirgendir ve beyin su homeostazisine katkıda bulunduğu kabul edilmektedir [42]. Ayrıca, AQP-1'in beyin hasarını takiben ödem oluşumunda ve hipokampüste hücre ölümünde rol oynadığı rapor edilmiştir [43]. Beyin ödemi, enerji ihtiyacında bir dengesizliğe neden olmakta ve glutamatın postsinaptik etkilerine [44] ve iskemi sonrası penumbra sinaptik iletimin engellenmesine [45, 46] yol açmaktadır. Önceki çalışmalarda, beyin felcinin sinaptik belirteçler olan sinaptofizin ve PSD-95'in ve sinaptogenezin düzenlenmesinde önemli görevi olan MAP2'nin ekspresyonunu baskıladığı belirtilmiştir [47]. Kompanse edilmemiş beyin felcinden birkaç dakika sonra, hücre ölüm yolları sağkalımı uyaran yolları baskılamakta ve üç etkileşim mekanizması yoluyla nöronal ölüme neden olmaktadır: aşırı glutamat varlığına dayandırılabilen egzitotoksiste, oksidatif stres ve apoptotik yolların uyarılması [48, 49]. Ayrıca,

iskemide kalsiyumun düzenlenmesinde bozulma ile ilişkili mekanizmalar da hücre ölümünü uyarabilir. Kalsiyum tamponlama kapasitesi, kalsiyum kanalı aktivitelerinin düzenlenmesinde bozulma ve diğer kalsiyumla ilgili proteinlerin egzitotoksisite, bozulan enerji metabolizması ve oksidatif stres nedeniyle değişiklik göstermesi ile ilişkilendirilmektedir. Anormal hücrel kalsiyum yükü, kaspaz aktivasyonuna yol açan sinyallerin arttırılmasıyla veya lipazlar ve nükleazlar tarafından yürütülen diğer katabolik süreçlerin tetiklenmesiyle hücre ölümünü tetikleyebilir. Artan trombinin de sinaptik fonksiyonda bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir [50]. Önceki çalışmalarda, iskemik yarı kürede trombin aktivitesinin anlamlı oranda artarak iskemik merkez düzeyinde pik seviyelere eriştiğine işaret edilmektedir [51]. Buna ilaveten, uzamsal dağılım analizi, yüksek trombin aktivite düzeylerinin peri-infarkt alanlarda saptandığını göstermektedir. Yüksek trombin düzeyleri, uyarılabilirliği [52] ve apoptozu doğrudan tetikleyerek daha sonraki aşamalarda hücre ölümünü [53] uyarmaktadır. Peri-infarkt alanlarda yüksek trombin aktivite düzeylerinin bulunması, iskemik bir olay sonrası peri-infarkt alanlarda fonksiyonu etkileyebildiğini de göstermektedir. Beyin felci reperfüzyon hasarı, serbest radikal oluşumunun yanı sıra hipokampus hasarı ve sinaptik iletimin uzun süreli fonksiyonel bozukluğuna neden olmakta ve ayrıca öğrenme ve hafıza kusurları meydana getirmektedir. Ayrıca, iskemi, adenosin tri fosfat (ATP) ve nörotransmitter üretimini ve depolanmasını engelleyerek sinaptik iletimi inhibe edebilir. Buna ilaveten, beyin felci hasarı altında beyin GLU sisteminin bozulmasının birçok nörodejeneratif hastalığın bilişsel hasarı ile ilişkili olduğu ve öğrenme ve hafıza kapasitesini etkilediği belirtilmiştir. Bu hasarlar, aşırı sinaptik glutamat birikimine katkıda bulunarak bir dizi hücre içi biyokimyasal değişikliği tetiklemekte ve sonunda nöron hücresi ölümünü uyarmaktadır. Aynı zamanda, eksitotoksitasyonu sınırlandırmanın gamma-aminobutirik asit (GABA) aracılı inhibisyonu arttırarak elde edilebildiği ve merkezi sinir sisteminde GLY gibi bazı inhibitör amino asitlerin hipoksi altında rat kortikal nöron hücrelerinde sinirleri koruduğu gösterilmiştir.

5.1. Beyin felci sonrası plastisitenin hücrel ve moleküler substratları

İletişim ağının yeniden organizasyonu ve motor fonksiyonun yeniden kazanılması süreçlerinin altında yatan mekanizmalarla ilgili birçok konu henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu mekanizmalar, eşik değerinin altındaki var olan bağlantıların veya yeni liflerin filizlerinin maskelenmesine neden olabilir [54]. Bu

bağlamda, GABAerjik sistem ve ekstrasellüler matrisin bu plastisite olaylarının kontrolünde önemli görevleri bulunabilir. Örneğin, yoğunlaşmış kondroitin sülfat proteoglikanlardan oluşan özelleşmiş ekstrasellüler matris yapıları olan Perinöronal Ağlar (PNA'lar) beyin plastisitesi ve tamiri ile ilişkilendirilmiştir ve bu ağlar özellikle hızlı voltajı yükselen parvalbümin pozitif internöronlar olmak üzere GABAerjik nöronların somalarını çevrelemektedir [55]. PNA'ların görevi kritik dönemin açılması ve kapanmasıyla ilişkili olarak görsel sistemin olgunlaşması sırasında kapsamlı olarak incelenmiştir [56, 57]. PNA'ların olgunlaşmış bağlantıları stabil hale getirdiği ve spina hareketliliğini ve fonksiyonel plastisiteyi baskıladığı düşünülmektedir. Merkezi sinir sistemi (MSS) hasarını takiben, bakteriyel bir enzim olan kondroitinaz ABC enjeksiyonu ile PNA'ların ortadan kaldırılması sensörimotor iyileşmesini arttırmaktadır [58-60]. Ayrıca, yakın tarihli bir çalışmada perilezyonel kortekste PNA sayısında spontane azalma olduğu bulunmuş ve plastisitede artış olduğuna işaret edilmiştir [61]. GABAerjik sistem aynı zamanda duyusal kortekslerde erken "kritik dönemlerin" açılması ve kapanması ile [62] ve iskemi sonrası motor gerikazanım ile ilişkili olarak da çalışılmıştır. Önceki çalışmalarda, iskemi sonrası GABAerjik sinyalleri arttırmanın iskemi sonrası performansı iyileştirmede [63], ancak bunun yerine iskemi hastalarında motor hasarın akut halde yeniden ortaya çıkmasını arttırdığı gösterilmiştir [64]. Ayrıca, insanlardaki bir korelasyon çalışmasında, GABAerjik inhibisyonda azalmanın fonksiyonel gerikazanımla ilişkili olduğu gösterilmiştir [65]. Beyindeki inhibitör etki, esasen çok sayıda GABAA reseptör ailesi üzerinden GABA sinyalleri yoluyla sağlanmaktadır [66, 67]. Bu iyonotropik reseptörler farklı alt birimlerden oluşmaktadır ve oluşan moleküler yapı farklı hücre bölgelerinde lokalizasyonu (örn. sinaptik veya ekstrasinaptik) ve sonuç olarak reseptörün biyolojik etkisini belirlemektedir [68]. Fokal iskemi sonrasında, bu GABAA reseptör komplekslerinde önemli oranda yeniden organizasyon görülmektedir [69]. Yapılan bir çalışmada, tonik GABAerjik sinyal sisteminin iskemi sonrası arttığı gösterilmiştir [70]. Gerçekten de beyin kesitlerinden alınan kayıtlar, GABAA reseptöründeki artışın katman 2/3 piramidal nöronlarda tonik inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir. Bir benzodiazepin ters agonisti kullanılarak iskemiden sonraki ilk haftalarda bu yükselen inhibisyonun deneysel olarak azaltılması, çeşitli davranışsal görevlerde ön uzuv fonksiyonunda anlamlı iyileşmeler sağlamıştır. Buna ilaveten, $\alpha 5$ veya $\alpha 1$ -GABAA reseptörleri (tonik GABA akımını sağlayan) bulunmayan transgenik fareler iskemi sonrası fonksiyonda daha az bir hasar sergilemiştir [70, 71]. Yakın tarihli bir

çalışmada, fazik GABA iskemiden sonraki ilk haftada, özellikle perilezyonel korteksin 5. katmanında artmıştır ve tedavi süresi boyunca GABAA reseptörleri dahil $\alpha 1$ 'in pozitif düzenleyicisi ile tedavi motor sonucu iyileştirmiştir [72]. Ancak, midazolam uygulamasının hemiparezik hastalarda iskemi hasarını geri getirdiğine yönelik klinik gözlemler ile bu son bulguların uzlaşması zor görünmektedir [64]. GABAA reseptörlerinin ters bir agonisti olan ve $\alpha 1$ yönünden zengin reseptörlere karşı yüksek bir önceliğe sahip olan DMCM kullanılarak iskemiden sonraki ilk haftada GABA sinyalini azaltmanın [73, 74], genel motor sonucu kuvvetli oranda iyileştirdiği ve etkilerin tedavinin sonundan sonra da kalıcı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, bu bulgular GABA sisteminin terapötik müdahale için farklı olasılıklar sunduğuna işaret etmektedir ve terapötik tedavilerin uygun zamanlamasını ve hedefini (fazik veya tonik) daha iyi bir şekilde nitelendirmek amacıyla daha fazla çalışma gerçekleştirilmelidir. Egzitatör nörotransmisyonun görevi aynı zamanda iskemi sonrası iyileşme ile ilişkili olarak çalışılmıştır. Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) reseptörlerinin farmakolojik aktivasyonu, beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) nörotrofini salgılanmasını ve TrkB reseptörlerinin fosforilasyonunu arttırarak motor sonucu iyileştirmektedir [75]. Ayrıca, BDNF düzeylerinde artış ve TrkB aktivasyonu, seçici bir antagonist olan memantin kullanılarak N-methyl-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin bloke edilmesinden sonra da saptanmıştır. Önceki çalışmadaki gibi, BDNF sinyal yolağının aktivasyonu motor performansta iyileşme ile ilişkilendirilmiştir [76]. Bu nedenle, BDNF'nin aktiviteye bağlı olarak salgılanmasının motor geri kazanım için önemli olduğu görülmektedir [77]. Aslında, BDNF modülasyonunun transkraniyal doğrudan akım uygulaması gibi perilezyonel korteks uyarılabilirliğini arttıran tedavilerin terapötik etkilerini sağladığı da ifade edilmiştir [78, 79]. İskemi, miyelin bileşenleri (Nogo-A, myelin-ilişkili glikoprotein) ve kılavuz molekülleri (efrinler, semaforinler) gibi çeşitli nöral rejenerasyon, filizlenme ve plastisite inhibitörlerinin de üretimini uyarmaktadır. Anti-plastisite ajanlarını etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla, Nogo-A antikoru gibi ilaçların uygulanmasının çok sayıda kortikal ve spinal hasar hayvan modellerinde akson rejenerasyonunu, filizlenmeyi ve fonksiyonel gerikazanımı iyileştirdiği görülmüştür [80-83]. Özellikle, motor egzersizden önce uygulanan anti-Nogo-A antikoru tedavisi motor gerikazanımı önemli oranda iyileştirmektedir [84]. Bu çalışmada, tedavi zamanlamasının önemli olduğu bulunmuştur. Gerçektende anti-Nogo-A'nın motor egzersiz sırasında verilmesi motor hasarını iyileştirmekte etkili

olmamıştır [84]. İskemi sonrasında, peri-infarkt bölgesinde 43 kDa'lık büyüme ile ilişkili protein (GAP43), CAP23, c-Jun gibi klasik aksonal büyüme belirteçlerinde bir artışla beraber “filizlenme belirteçlerinde” sabit bir değişim, ancak aynı zamanda daha geç zaman noktalarında efrin-A5, CSPG'ler ve diğerleri gibi büyüme inhibe edici genlerde paralel bir artış rapor edilmiştir [85, 86].

5.2. İskemide peri-infarkt aksonal filizlenme

Beyin felci, enfarktüs alanına yakın veya bu alanla bağlantılı kortikal alanlarda aksonal filizlenmeyi tetiklemektedir. Bu durum, beyin felcinden sonraki üç hafta kadar önce dahi kortikal devrelerin anatomik olarak haritalandırılmasıyla tespit edilebilir [86] ve kabaca beyin felcinden bir ay sonra [87, 88] ve birkaç ay sonra [89, 90] görülür hale gelmektedir. Peri-infarkt aksonal filizlenmenin başlangıç aşaması ilk hafta içinde gerçekleşmektedir [87]. İskemi sonrası peri-infarkt kortekste aksonal filizlenme, enfarktüsü çevreleyen dokuda ve hasara uzak olan motor, somatosensör ve premotor alanlarda ortaya çıkmaktadır. Motor veya somatosensördeki bağlantılar kontrol, iskemi-olmayan durumda haritalandırıldığında ve iskemiden sonra aynı motor ve duyuşsal projeksiyonlar ile karşılaştırıldığı zaman bağı aksonal filizlenme saptanmaktadır. Bu tür çalışmalarda, yeni projeksiyonlar komşu somatosensör kortekste, örneğin, sıçanlarda somatosensör kortekste ki ufak çaplı felçten 3 hafta sonra oluşmaktadır. Bu yeni projeksiyonlar, somatosensör sistemdeki kortikal projeksiyonların topografisini değiştirmekte ve projeksiyonların agregat haritasını anlamlı olarak ötelemektedir [86]. Motor veya somatosensör kortekste ki daha büyük çaplı iskemilerde, iskemi sonrası motor kortekste ki aksonal projeksiyonlarda anlamlı bir değişiklik de görülmektedir. Bu durum, kontrol, iskemi olmayan ile iskemi gerçekleştirilen farelerde ön uzuv motor kortekse bir traser madde enjeksiyonundan sonra kortikal bağlantıların kantitatif olarak haritalandırılması ve daha sonra kortekste ki bağlantıların yerlerindeki değişikliklere karşı popülasyon istatistiği veya polar istatistik kullanılması yoluyla test edilebilir. Bu fare iskemi modellerinde iskemiden bir ay sonra, motor korteksten premotor kortekse ve primer ve sekonder somatosensör kortekse anlamlı oranda farklı ve yeni bağlantılar oluşmaktadır [87, 88, 91]. Maymunda iskemi de somatosensör ve premotor korteks arasındaki projeksiyonların anatomik olarak etiketlenmesi yoluyla saptanan benzer bir aksonal sprouting modeli oluşturmaktadır [90]. Ayrıca, iskemi enfarktüs bölgesinin yanındaki sensorimotor korteksten parietal kortekse giden projeksiyonların şeklinde görünür bir

değişikliğe neden olmaktadır [89]. Fare, sıçan ve maymundaki bu aksonal filizlenme modelleri, insandaki peri-infarkt motor, premotor ve somatosensör alanlardaki motor kontrolün fonksiyonel haritasındaki değişikliklerle çakışmakta ve dolayısıyla iskemi sonrası beyinde benzer plastisite alanları bulunduğuna işaret etmektedir.

5.3. İskemi sonrası kontralateral kortikal aksonal filizlenme

İskemi, kontralateral hemisferin korteksinde yer alan nöronlardan da aksonal filizlenmeyi tetiklemektedir. Kontralateral kortekste kortikospinal nöronlar, kortikospinal traktustan servikal omuriliğe projeksiyonlar uzatmaktadır. Bu kontralateral kortikospinal aksonal filizlenme iskemi sonrası sıçan, farede ve insan harici primatlarda ve diğer kortikal lezyonlarda rapor edilmiştir [92-94]. Bu motor kortekste ipsilateral uzvun motor reprezentasyonlarının yeniden haritalandırılmasıyla ilişkilendirilmektedir [93]. Belirtildiği üzere, daha geniş çaplı iskemiler daha büyük kontralateral kortikal aksonal filizlenme ile ilişkilendirilmektedir. Bu durum kemirgen iskemi modellerinde görülmektedir ve yakın zamanda daha geniş frontal lezyonların kontralateral primer motor korteksten servikal omuriliğin hasar görmüş ventral boynuzuna daha fazla aksonal filizlenmeye neden olduğunun gösterildiği insan harici primat çalışmalarında valide edilmiştir [94]. Bu insan harici primat çalışmasında, kontralateral motor korteksten aksonal filizlenmenin motor korteksi içeren iskemilerde indüklenmesi, ancak ilgili lezyonun sadece motor korteksi değil, aynı zamanda parietal somatosensör korteksi de içermesi durumunda baskılanması ilginçtir [94]. Bu durum, kemirgen çalışmalarında değeri anlaşılmamış iskemi sonrası aksonal filizlenme yanıtındaki kompleks durum düzeyine, iletişim ağının nöronal aktivite seviyelerindeki etkilerine, spesifik projeksiyon sistemlerinden lokal trofik faktör salgılanmasına veya muhtemelen somatosensör girdi kaybedildiği zaman aksonal filizlenme ile davranışsal bir aktivite etkileşimine işaret edebilir. Aksonal filizlenme aynı zamanda beyin felcine kontralateral olan korteksten beyin felcine ipsilateral olan striatuma doğru da görülmektedir [95-97]. Son olarak, beyin felcine kontralateral olan korteksten aksonal filizlenme, beyin sapındaki red nükleusta normal projeksiyon alanından karşı taraftaki hasarlanmış red nükleusa doğru da oluşmaktadır. Kontralezyonel kortikospinal sistemdeki bu aksonal filizlenme, davranışsal gerikazanım açısından önemlidir. Beyin felcine kontralateral olan korteksten ipsilateral servikal omuriliğe doğru spesifik projeksiyonlar seçili bir şekilde inaktive edildiğinde, motor gerikazanım engellenmektedir [98]. Dolayısıyla, kontralateral kortikospinal devrelerde aksonal

filizlenme bu geniş hacimli iskemi modellerinde nedensel olarak iyileşme ile ilişkilendirilmektedir. Geniş hacimli iskemilerde sağlam, kontralezyonel kortikospinal traktus hasarlanmış alanlara doğru filizlenme yapabilse de daha küçük iskemilerden sonra hasar görmeyen hemisferdeki diğer kortikal devreler aslında beklenmedik bağlantılar oluşturabilir. Örneğin, tek taraflı iskemi sonrası felç görülmeyen uzvun egzersizi iskemiden etkilenen uzvun rehabilite edici egzersizinin sonucunu azaltmaktadır [99, 100]. Ayrıca, felçten etkilenmeyen uzvun aşırı kullanımı, perinfarkt kortekste ön uzuv representasyonunda azalma ve belki de transkallosal nöronlardan anormal sinaps oluşumu ile ilintilidir [101]. Bu etkiler, “öğrenilmiş kullanmama” olayı nedeniyle veya iskemi sonrası iyi olan uzvun kullanılmasına yönelimin artması hemipareziden sonra yaygın olarak görülen bir durum olduğundan ve devrenin tedavi edilmesini ve motor gerikazanımı baskılayabildiğinden, klinik olarak önemli bir durumdur. Kontralateral korteksin gerikazanımı etkisinin zararlı olduğu, kontralezyonel korteksin 3-14 gün boyunca muskimol ile inaktivasyonunun davranış sonucunu iyileştirdiği bloklama çalışmasında da gösterilmiştir [102]. Bu sonuç, farklı iskemi hayvan modellerinde (beyin felcine) kontralateral olan korteksin hem iyileşmeyi sağladığını hem de iyileşmeyi geciktirdiğini göstermektedir. Genel olarak, iskemi sonrası kontralateral korteksin görevini tam olarak ortaya çıkarmak için hem telafi edici hem de iyileştirici olan ilgili davranışsal paradigmların yanı sıra iskemi kapsamının ve yerinin de analiz edilmesi gerekmektedir.

5.4. İleri mikroskop teknikleri ve şeffaflaştırma

Biyolojik dokularda mikroskop altında görüntü almak her araştırmacı için çağımızın vazgeçilmez ihtiyaçları arasındadır. Birkaç yıl öncesine kadar dokular mikrotom tarafından kesilip belirli kalınlığa kadar mikroskop altında görüntülenebiliyordu. Alınan kesitlerin hem ince olması hem de iki boyutlu olması araştırmacılar için çok fazla anlam ifade etmemeye başladı. Bu sebeplerle mühendisler, biyologlar, fizikçiler birlikte düşünmeye başlayarak görüntüleme konusunda çığır açacak girişimlerde bulundular.

5.4.1. Nöron izleme ve yeniden yapılandırma

Nöron izleme ve yeniden yapılandırma, bir nöronun gövdesinin, aksonunun, dendritlerinin ve dikenlerinin betimlendiği ve yeniden yapılandırıldığı bir süreç olup geometrik bir model oluşturulmasıdır [103]. Tek bir hücrenin morfolojik özelliklerinin

bu hücrenin nöronal dinamiklerini ve sinaptik plastisitesini belirlediği giderek artan bir şekilde kabul görmektedir [104-110]. Aynı şekilde, karakteristik dallanma yapıları nöronların spesifik ateşleme modelleriyle ilişkili olabilir [107, 109, 111-113]. Ayrıca, nöronal dendritik ağaçların organizasyonundaki değişimler her bir nöronun son derece organize bir nöronal iletişim ağına bir parçası olduğunu göstermektedir. Fonksiyon ile yapı arasındaki önemli bağlantı, kendisini global ve lokal nöron yapılarındaki bozuklukların (yani, iletişim ağı düzeyindeki veya tek bir hücre düzeyindeki bozukluklar) görünür olduğu nörolojik hastalıklarda ortaya koymaktadır. Yapı ile fonksiyon arasındaki bu bağlantıyı daha ayrıntılı açıklamak amacıyla, araştırmacılar nöronların morfolojik olarak analizini sağlayan bilgisayar destekli ve otomatik nöron yeniden yapılandırma teknikleri kullanmaktadır. Elde edilen 3 boyutlu yeniden yapılandırmalar, sadece bütün nöronal proses uzunluğunu değil, aynı zamanda dallanma sıklığı, segment uzunluğu, dal açısı, spina veya reseptör yoğunluğu ve segment çapı gibi diğer morfolojik özellikleri de görüntülemek ve analiz etmekte kullanılmaktadır. Bu yapısal parametrelerin tek bir nöronun ve nöronal iletişim ağlarının fonksiyonu ile yapısı arasındaki ilişki hakkında bilgi sunması beklenmektedir.

Tek bir hücrenin veya hücre ağlarının projeksiyonlarını 3 boyutlu şekilde yeniden yapılandırmak için birçok görüntüleme yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemlerin bazıları tek bir hücrenin görüntülenmesi için de kullanılabilir. Bu tekniklerin sinirbilim araştırmasında kullanımına yönelik örnekler mevcuttur. Yeşil floresan proteinin nöronlarda transgenik anlatımı, lazer taramalı konfokal mikroskop (LTKM) ile fikse edilmiş dokuda görüntülenmiştir [114-116]. Bu yöntemi özellikle kullanışlı hale getiren birçok özellik bulunmaktadır: (i) GFP bir proteindir. Dolayısıyla, hücreler, kromoforun kendisini vermek yerine bir cDNA'nın (transgenik olarak) iletimi ile floresan hale gelebilir. (ii) GFP kromoforu, tamamen polipeptid zincirden türetilmektedir. Aynı şekilde, GFP-anlatımı yapan hücreleri floresan hale getirmek için herhangi bir yabancı kofaktörün veya substratın iletilmesine gerek yoktur. (iii) GFP, floresanda herhangi bir kayıp olmaksızın başka proteinlere birleştirilebilir. (iv) GFP, spektral özelliklerinde değişiklik olan ve daha iyi translasyonel etkinliğe, termostabiliteye ve kuantum verime sahip varyantlar oluşturmak üzere mutasyona uğratılabilir.

Nöronların GFP anlatımı yapan viral vektörler ile enfeksiyonu, LTKM kullanılarak fikse edilmiş dokuda görüntülenmiştir [117]. Literatürde, nörotropik herpes virüsleri gibi doğal tür veya genetiği değiştirilmiş virüslerin kullanımına yönelik bazı raporlar bulunabilir [118]. Bu teknik, nöral doku kültürlerini in vitro ortamda bu moleküllerin anlatımını yapan viral vektörlerle enfekte ederek hastalıkla ilişkili moleküllerin nörodejenerasyona etkilerini çalışmak ve bu molekülleri floresan bir protein ile birleştirerek tek bir hücre içerisindeki varlıklarını kontrol etmek için kullanılabilir. Hücreleri farklı floresan boyalarla doldurmak ve varsayılan sinapsları araştırmak için, iki fotonlu lazer tarama mikroskopisi ile canlı doku kesitleri görüntülenmiştir [119]. Bu teknoloji, nöron çiftleri arasındaki tek bir sinaptik bağlantının fonksiyonel analizinde önemli hale gelmiştir. Hücreleri bir izleyici madde (*traser*) ile doldurmak ve traserin gap bağlantılar (*gap junctions*) yolu ile diğer bir nörona geçişini araştırmak için, parlak alan (*brightfield*) mikroskopisi ile sabit doku örnekleri görüntülenmiştir [120]. Bu tekniğin uygulanması nöronlar arasındaki elektriksel sinapsların görüntülenmesini sağlamaktadır. Hücreleri floresan bir boya ile doldurmak ve immünohistokimya yoluyla nörokimyasal belirteçlerin kolokalizasyonunu araştırmak için LTKM ile sabit doku görüntülenmiştir [121, 122]. Bu teknoloji, nörokimyasal sistemlerin invazyon modellerinde hedef spesifikliği gösterip göstermediğini belirleme imkanı ile birlikte büyük ölçekte nöronal devreleri analiz etmeyi sağlayan önemli bir teknolojidir. Floresan proteinlerinin tümleşik transgenik ekspresyonu (Brainbow transgenleri) LTKM ile sabit dokuda görüntülenmiştir [116]. Brainbow sistemi, temel olarak (i) GFP'yi değişik spektral özelliklere sahip varyantlar bu proteinler toplu olarak "XFP" terimi verilmiştir) oluşturmak için mutasyona uğratabilme olasılığına ve (ii) üç veya daha fazla XFP arasında rastgele bir ekspresyon seçimi oluşturmak üzere Cre/lox rekombinasyon sisteminin kullanımına dayanmaktadır. Cre/lox sistemi (deoksiribo nükleik asit) DNA kesme, ters çevirme veya kromozomlar arası rekombinasyon yoluyla gen ekspresyonunun başlatılmasını sağlayabilir [123]

Nöron membranlarına bağlanan lipofilik boya kombinasyonları kullanarak çok renkli DiOlistik etiketleme LTKM ile canlı ve sabit dokuda görüntülenmiştir [124]. Bu da canlı veya sabit dokuları farklı floresan boyalarla hızlı bir şekilde etiketlemeye yarayan başka bir yöntemdir ve transgenik GFP anlatımına, nöronların GFP anlatımı yapan viral vektörlerle enfeksiyonuna veya Brainbow sistemine alternatif olarak ele

alınabilir. Ayrıca, bu yaklaşım çok ince spina boyunları gibi klasik hücre doldurma tekniğiyle görüntülenmeye hücre bölümlerinin etiketlenmesine izin vermektedir [125].

GFP'nin nöronlarda transgenik anlatımı, in vivo ortamda nöronlara en az zararı verecek şekilde görüntülemek amacıyla iki fotonlu lazer tarama mikroskopu ile canlı bir hayvanda in vivo görüntülenmiştir [115].

5.4.2. Şeffaflaştırma

5.4.2.1. Solvent bazlı şeffaflaştırma

Dehidrasyon veya şeffaflaştırma aşamalarında kullanılmak üzere bir dizi çözücü test edilmiştir [126]. En yaygın olarak, dehidrasyon anında hegzan içeren veya içermeyen metanol veya tek başına tetrahidrofuran kullanılarak gerçekleştirilmektedir [126-129]. Bu ajanlar suyu uzaklaştırırken, aynı zamanda bazı lipidleri de çözmekte ve uzaklaştırmaktadır. Suyun ve lipidlerin uzaklaştırılması, oldukça homojen, esasen proteinden oluşan, yoğun (yani refraksiyon indisi yüksek) bir numune sağlamaktadır. Dehidrasyona tabi tutulmuş proteinin refraktif indisi 1,5'tan yüksektir (sudan veya lipidden yüksektir). Bu nedenle, dehidrasyon aşamasını numuneyi şeffaflaştırmak amacıyla yağdan arındırılan ve dehidre edilen dokunun daha yüksek refraktif indeksiyle eşleşerek ilave lipidleri çözen ve numune boyunca homojen bir şekilde karışan bir ikinci ajan grubu takip etmelidir. Bugüne kadar, nihai şeffaflaştırma çözeltisi olarak metilsalisilat, benzil alkol, benzil benzoat, diklorometan ve dibenzil eter (DBE) kullanılmıştır [126-130].

5.4.2.2. Hidrojele gömme

Buraya kadar tartışılan su bazlı şeffaflaştırma yöntemleri, küçük (Basit Batırma) numuneleri şeffaflaştırma ile veya çok yavaş olmasıyla (Hiperhidrasyon) sınırlıdır. Ayrıca, katı çözücüler ve yüksek deterjan konsantrasyonlarını kullanan herhangi bir teknik, dokunun protein içeriğinin büyük bir miktarını da uzaklaştırma riskini içermektedir. CLARITY ve PACT/PARS yöntemleri, ilk olarak dokunun hidrojele gömülmesiyle bu konuları ele alma girişiminde bulunmaktadır [131-133]. Hidrojele gömme işlemi tamamlandıktan sonra, lipidler deterjan içinde (%8 SDS) bir hafta boyunca pasif olarak veya elektroforez yöntemiyle hızlı bir şekilde (günler içinde) uzaklaştırılmaktadır. FocusClear, Histodenz bazlı şeffaflaştırma çözeltisi RIM'ler, TDE veya %80 gliserol içinde daldırmadan oluşan son bir aşama, numunenin

tamamen şeffaflaştırılmasını sağlamaktadır. Yakın tarihte, bir numune boyunca hidrojel polimer ağı sentezleyen ve ardından bunu 4,5 kat arttıran (esasen, hiperhidrasyonu ve hidrojel gömdürmeyi birleştiren) Expansion Mikroskopunun geliştirilmesi, eğer numune hidrojele gömülürse şeffaflaştırmada hidrasyonun oynayabildiği görevi göstermiştir [134]

5.4.3. Şeffaflaştırılmış dokunun görüntülenmesi

Floresan ışık mikroskopisindeki gelişmeler, günümüzde şaşırtıcı bir hızla ilerlemektedir. Çok sayıda farklı optik kesit alma tekniği ticari olarak satın alınabilmektedir. Bunlardan çoğu da şeffaflaştırılmış dokunun görüntülenmesi için doğrudan kullanılabilir. Bu optik kesit alma teknikleri konfokal, 2-Foton mikroskop ve ışık perdeli (lightsheet) floresan mikroskopunu içermektedir [135-137]. Bu tekniklerden, 2-Foton mikroskop, şeffaflaştırılmamış dokunun derinlemesine görüntülenmesi için en uygun yöntemdir. Ancak, ışık saçılması sınırlandırıcı faktör olmaktan çıktığında, mikroskop kullanıcılarının floresan tekniklerden hangisinin kendi örnekleri için en uygun teknik olduğunu yeniden değerlendirmesi gerekecektir. Şeffaflaştırılmış doku görüntülemenin, yeni mikroskop teknolojilerinin ve bileşenlerinin gelişimini itekleyen güç haline gelmesi ilginçtir. Ayrıca, yaban turbu peroksidaz (HRP), diğer peroksidaz reaksiyon ürünleri (örn. APEX [138]) veya gümüş boyaları (örn., Golgi boyası) gibi ışığı yansıtan bazı etiketlerin artık şeffaflaştırma sayesinde daha kalın hacimlerde görüntülenebilmesi olasılığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yansıtılmış ışık konfokal bir geri dönüş yapabilir [139, 140].

5.4.4. Konfokal ve 2-foton mikroskopta çalışma mesafesi: şeffaflaştırılmamış doku

Bir objektifin çalışma mesafesi, fiziksel ön lensi ile numune içindeki odak noktası arasındaki uzaklıktır. Konfokal mikroskoplarının şeffaflaştırılmamış dokuda sınırlı bir penetrasyon derinliği (yaklaşık 100-200 μm) bulunmaktadır. Bu nedenle, en yüksek sayısal diyafram açıklığı (çözünürlüğün temel belirleyicisi, NA) 200 μm 'den daha düşük çalışma mesafeleriyle tasarlanmıştır. NA ve çalışma mesafesi genel olarak ters orantılıdır; çalışma mesafesi 1 mm'den fazla olan birçok objektifin çözünürlük kuvveti daha düşüktür, özellikle de aksiyal boyut anlamında zayıftır.

Teorik ve deneysel çalışmalarda daha önce, saçılma dokusunda (*scattering tissue*) 1 mm derinliğinde 2-Foton mikroskopun yaklaşık derinlik sınırı olduğu

belirtilmiştir [141, 142]. Bu derinlikte görüntüleme yapılırken, saçılma odak noktasına gelen uyarılma ışığını zayıflatmaktadır. Buna ek olarak, odak noktası daha derine hareket ettikçe kum saati şeklindeki lazer ışını tarafından aydınlatılan dokunun hacmi hızlı bir şekilde artmaktadır. 2-Foton uyarılma olasılığı odak noktası haricinde düşük olmasına karşın, bazı 2-Foton uyarılma olayları bu noktanın dışında ortaya çıkmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, belirli bir derinlikte, floresan uyarılma olaylarının odak noktası dahilinde ortaya çıkma ihtimali kadar odak noktasından uzakta da ortaya çıkma ihtimali bulunmaktadır. İğne delikleri (*pinholes*) 2-Foton görüntülemeye kullanılmadığından, odak noktasında ve odak dışında floresan yayılma objektif tarafından toplanmakta ve tekrar detektörün üzerinde görüntülenmektedir. Bu nedenle, maksimum derinlikte, odak dışı floresan görüntüye hakim hale gelmeye başlamaktadır. Bir iğne deliği odak hacminin dışındaki saçılma olaylarından kaynaklanan floresanı hariç tutmakta kullanılabilmesine karşın, bu derinliklerde numune üzerinden objektife geri hareket ettiğinde fokal düzlemde oluşturulan floresan ışık son derece saçılmış hale gelmektedir. Bu saçılmış floresan ışığı daha sonra iğne deliği tarafından reddedilmekte, böylece sinyalin saptanamayan düzeylere düşürülmesi sağlanmaktadır [141]. Bu fiziksel sınıra karşın, milimetre aralığı içinde görüntüleme kapasitesine sahip yüksek çözünürlüklü objektifler gerektiğinden, 2-Foton mikroskobu, objektif tasarımlarını daha ileri itmiştir. Esasen su daldırma (*water dipping*) objektifleri olarak tasarlandığından, en önemli tasarım ögesi büyük çaplı ön lenstir. Daha büyük lens, yaklaşık 1,0'lık bir NA değerini korurken, objektifin 1-2 mm çalışma mesafesiyle tasarlanmasını sağlamaktadır.

5.4.5. Konfokal ve 2-foton mikroskopta çalışma mesafesi: şeffaflaştırılmış doku

Şeffaflaştırılmış doku, ışık saçılımından kaynaklanan penetrasyon sınırlarını ortadan kaldırmaktadır; yani, objektif çalışma mesafesi çok sıklıkla belirli bir mikroskopun ne kadar derini görüntüleyebileceğinin sınırlayıcı faktörüdür. Şeffaflaştırılmış doku görüntülemenin öncüleri, görüntüleme derinliğinin artık numune tarafından değil mikroskop objektifi tarafından sınırlandırıldığını keşfetmiştir. Uzun çalışma mesafesi (>5 mm), yüksek NA (>0.9) objektifleri artık birçok mikroskop üreticileri tarafından tedarik edilebilmektedir ve şeffaflaştırılmış doku görüntülemeye tercih edilen lenslerdir. Şeffaflaştırılmış doku sayesinde 1 mm'den daha büyük derinliklerde 2-Foton görüntülemenin gerçekleştirilebildiği artık kabul görmüştür. Ancak, numune içindeki derin noktalarda görüntü kalitesinde

belirgin bir azalma olduğu hala görülebilmektedir. Yayılan floresan ışığın saçılması şeffaflaştırılmış dokuda büyük oranda azalmaktadır; ancak, bir numune içerisinde derinlikte 2-Foton uyarılma kullanılırken, odak noktasının dışında hala bir miktar uyarılma gerçekleşmektedir. Bu nedenle, şeffaflaştırılmış doku ile geri dönen ışık yolunda fiziksel bir iğne deliği kullanımıyla, 2-Foton görüntüleme kalitesini iyileştirebilir ve böylece bir konfokal-2-Fotonlu mikroskop hibridi oluşabilir [143].

5.4.6. Konfokal ve 2-foton

Çalışma mesafesi, genellikle şeffaflaştırılmış dokunun görüntüleme kapasitesindeki sınırlayıcı faktördür. Bu nedenle, büyük aksiyal uzaklığa sahip bir dik (*upright*) mikroskop uzun çalışma mesafesine sahip objektiflerin ve kalın numunelerin kullanımı için esastır. Ancak, 2-Foton uyarılma sıklıkla gerekli değildir. Gerçekten de doğrudan karşılaştırıldığında, konfokal görüntüleme 1-Foton uyarılmanın daha yüksek etkinliğe sahip olması ve birden fazla boya ile etiketlenmiş dokularda daha düşük çapraz uyarılma olasılığı bulunması nedeniyle belirli numunelerde daha iyi sinyal/gürültü oranları üretebilir. Ayrıca, çok renkli konfokal görüntüleri, lazer çizgileri arasında hızlı değişiklik nedeniyle daha hızlı elde edilebilir (ayarlama gerekmemektedir). 2-Foton görüntüleme tamamen şeffaflaştırılmamış görüntüleme numuneleri dahil olmak üzere çok sayıda durumda hala avantajlı olabilir. Ancak hem konfokal hem de 2-Foton yöntemleri lazer tarama gerektirdiğinden zaman alıcı ve yavaş bir işlemdir. Aslında, 1000 mm³ hacme sahip bütün bir fare beyninin 20x/1,0'lık bir objektif kullanılarak taranması >4,200,000 görüntü (500 × 500 µm görüntü alanı ile aksiyal basamak boyutu olduğu varsayılarak) gerektirecektir. 1 Hz'lik görece hızlı bir tarama hızında, bu neredeyse 50 gün almaktadır. Bu nedenle, şeffaflaştırılmış dokunun konfokal ve 2-Foton görüntülemesi sadece küçük, lokalize bölgelerin yüksek çözünürlüklü görüntülemesinde pratiktir.

5.4.7. Işık perdeli mikroskop ile görüntüleme

Konfokal ve 2-Foton görüntüleme teknikleri büyük bir numuneyi görüntülemek için gereken zaman miktarı açısından büyük bir sınırlamaya sahiptir. Dolayısıyla, ışık perdeli mikroskopun yeniden icat edilmesi esasen 1903 yılında tanımlanmış ve 1925 yılında Nobel ödülü ile ödüllendirilmiştir ve son derece avantaj sağlamıştır. Işık perdeli mikroskopunun temel tasarımı (bir görüntüleme objektifinin eksenine dik olarak odaklanmış ince bir uyarılma ışığı tabakası) bütün ışık perdeli

floresan mikroskoplarda ortak olmasına karşın, çok sayıda farklı tasarım ortaya çıkmıştır.

Bütün ışık perdeli floresan mikroskop (IPFM) tasarımlarında, tek bir düzlem vardır ve sadece o düzlem uyarılma ışığı ile aydınlatılmaktadır. Bu tam aydınlatma, bir lazer ışınının numune boyunca yavaş bir şekilde tarama yapma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Bunun yerine, bütün bir düzlemin görüntüsü tek bir pozlama ile kameraya çekilebilmektedir. Hızlı bir bilimsel tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken (sCMOS) kamera ile kombine edildiğinde, okuma hızı veya numuneyi sonraki odak düzlemine hareket ettirmek için gereken zaman temporal numune alımında sınırlayıcı faktör haline gelmektedir. Saniye başına 20'den fazla düzlemin görüntülendiği hızlara kolaylıkla erişilebilmektedir. Ancak ne yazık ki, lightsheet'in fiziksel genişliği (aksiyal çözünürlüğü saptayabilir) ile görüntülenebilen hacim boyutu arasında bir değiş tokuş olduğu görülmektedir.

En ince lightsheetleri yansıtan teknikler (5 ila $<1 \mu\text{m}$): Objektif-Bağlı Düzlemsel Aydınlatma Mikroskopi [144], diSPIM [145], 2-Foton Lightsheet, Bessel Beam Lightsheet [146], Lattice Lightsheet [147] ve SCAPE [148] en iyi aksiyal çözünürlüğü sağlarken, sadece birkaç yüz mikrometre kalınlıkta ve alanı görece küçük numuneler ile sınırlıdır.

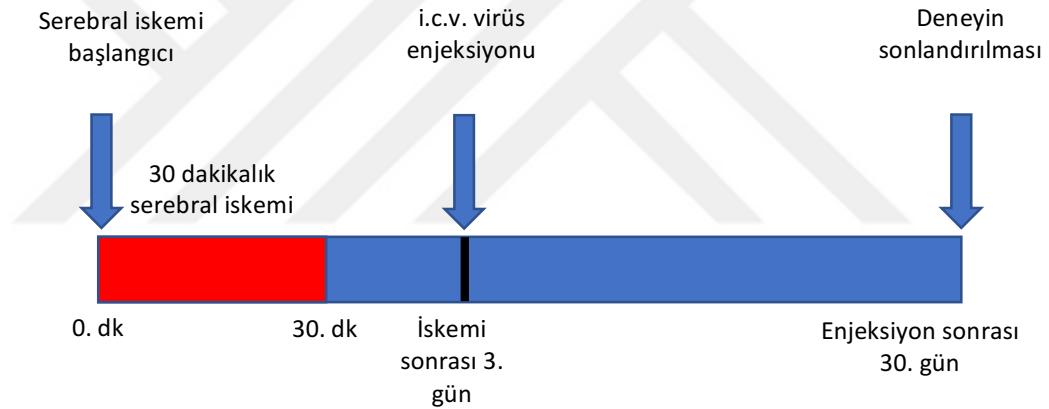
Daha kalın perdeler (4-40 μm) düşük NA odaklama optikleri ile birleştirilmiş silindirik lensler tarafından oluşturulmuştur ve çok daha geniş alanlar (cm^2) üzerine düzgün bir şekilde projeksiyon sağlayabilir ve daha derini görüntülemeye izin verebilmektedir (yüksek NA uyarılma ve görüntüleme objektifleri kullanıldığında ortaya çıkan yapısal engellemeyi önleyerek). Bu tasarımları kullanan ışık perdeli mikroskopları, en yüksek optik çözünürlük gerektirmeyen durumlarda şeffaflaştırılmış dokuların görüntülenmesinde kullanım için idealdir [127, 132, 149, 150].

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda beyin felcini takiben meydana gelen patofizyolojik süreçlerden plastisite yolaklarının daha iyi belirlenmesi ve üç boyutlu olarak haritalandırılmasının yapılması hedeflenmektedir.

6. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada kullanılan C57/BL6 türü fareler İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıbbi Araştırma Merkezinden temin edildi ve deney hayvanlarına uygulanan iskemi modeli, İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi, Beyin Araştırmaları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Deney hayvanları İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi'nden (MEDİTAM) temin edilip, bu merkezde bakıldı. Bu tez çalışması Medipol Üniversitesi yerel etik kurulunun 16.04.2017 tarihli 04 karar numaralı onayı ile yapılmıştır.

Yetişkin iki aylık farelere orta serebral arter tıkanması metodu ile beyin felci yapıp, post operatif bakımlarının ardından ve akut patofizyolojinin tamamlanmasının ardından 3. günde hayvanların motor kortekslerine viral vektör enjeksiyonları yapıp 30. günde hayvanlar (n=60) sakrifiye edildi (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Deney dizaynı.

6.1. Orta serebral arter oklüzyon modeli ve beyin kan akımı ölçümü

20-25 gram ağırlıkta erkek fareler %1 Isofluran (%30 O₂, kalanı N₂O) ile anesteziye alındıktan sonra vücut ısıları homeotermik ısıtma sistemiyle 36,5-37,0 °C arasında tutuldu. Beyin kan akımının ölçülmesinin yanında, beyin felci ve reperfüzyonunun kontrolü amacıyla Laser Doppler'in (LDF) probu (Perimed, Stockholm, Sweden) orta cerebral arter bölgesine (Bregma -2mm posterior; 6mm lateral) temporal kaslar ayrılarak direk kafatası kemiği üzerine açılan 0.5mm'lik açıklıktan korteks üzerine yerleştirilerek kaydedildi. 30 dakikalık fokal serebral iskemi daha önceki çalışmalarımızda olduğu gibi intraluminal teknik ile yapıldı [151-153].

6.2. Virüs hazırlama

Aksonal projeksiyonların belirlenebilmesi amacıyla hayvanların kontralateral ve ipsilateral motor kortekslerine anterograde olarak ilerleyen ve sürekli olarak ifade edilen GFP ve tdTOMATO adeno asosiye viral vektörleri hazırlandı [154].

6.2.1. AAV üretimi

Adeno asosiye viral vektörler (Şekil 6.2.1.) de gösterilen basamaklar takip edilerek yapıldı.

6.2.1.1. Transformasyon

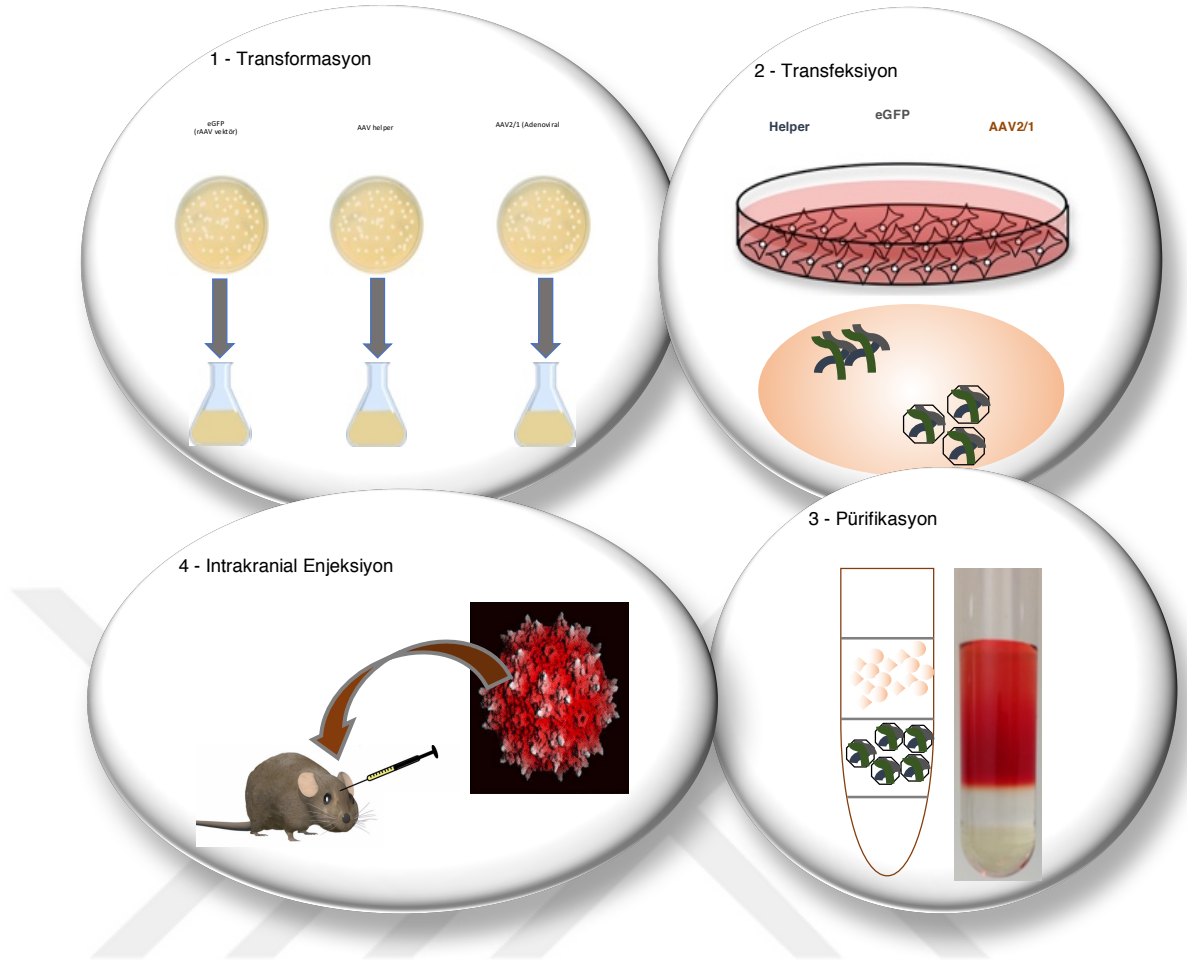
Kompetent hale getirilmiş *E. Coli* bakterisinin içine pAAV-CAG-eGFP ve pAAV-CAG-tdTomato plazmitleri transforme edildi. 37°C ve 250 rpm koşullarında 1 saat inkübe edilen bakteri ve plazmitler, bu sürenin sonunda katı besi yerinde büyütülmeye hazır hale getirildi. Bakteriler katı besi yerinde 18 saat boyunca 37°C’de büyütüldü. Seçilen koloniler sıvı besi yerine aktarıldı ve 8 saat boyunca 37°C’de büyütüldü. Bu işlem pAAV-CAG-eGFP, pAAV-CAG-tdTomato, Helper ve AAV2/1 plazmitleri için tekrarlandı.

6.2.1.2. Transfeksiyon

Transformasyon aşamasında elde edilen pAAV-CAG-eGFP, Helper ve AAV2/1 plazmitleri PEI transfeksiyon ajanı ile AAV293 hücre hattına verildi, verilen DNA’lar ile birlikte bu hücreler 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi ve aynı aşamalar pAAV-CAG-tdTomato için tekrarlandı.

6.2.1.3. Pürifikasyon

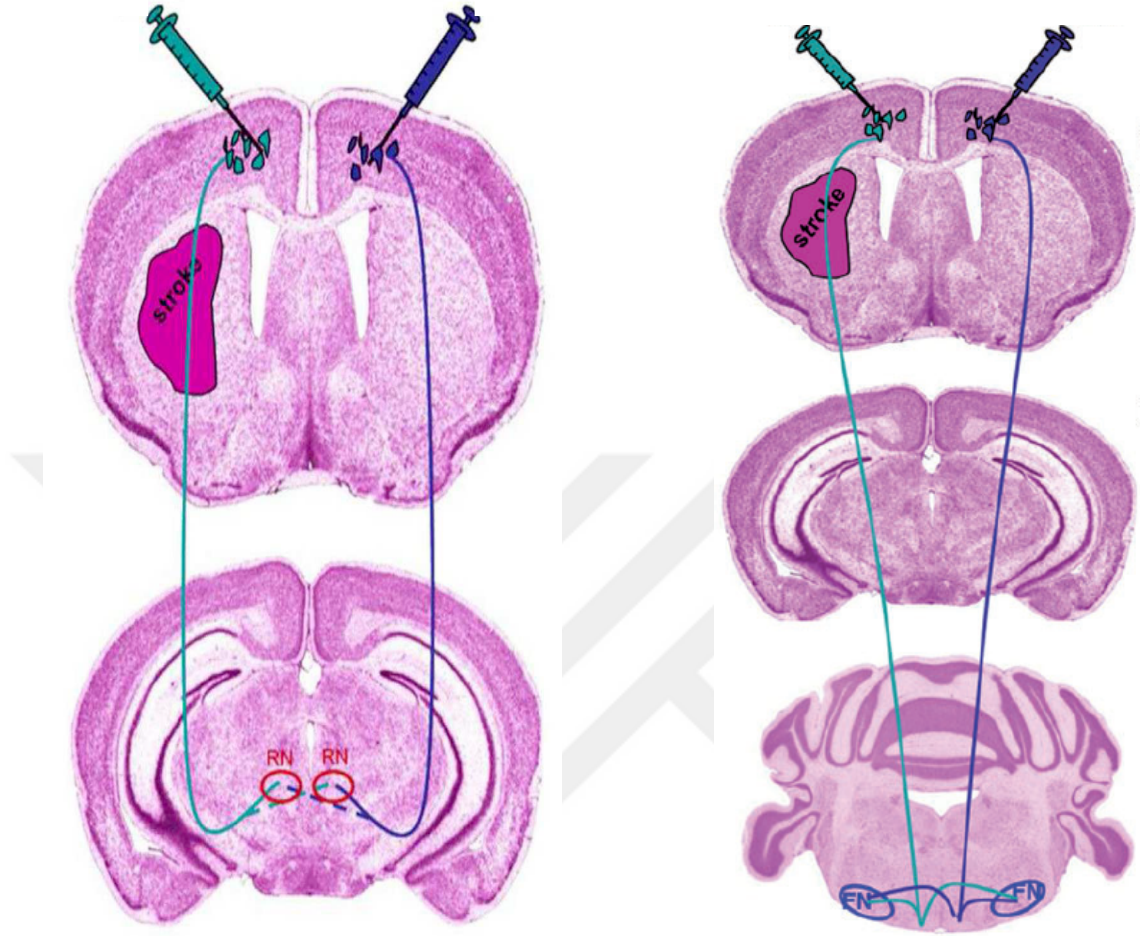
Toplanan hücreler sırayla 37°C ve kuru buz / EtOH yardımıyla patlatıldı. Hücre artıklarından arındırmak için ultra santrifüj ile katmanlarına ayrıldı. %17, %25, %40 ve %60’lik katmanlar hazırlandı. 18°C, 55000 rpm koşullarında 90 dakika boyunca yapılan ultra santrifüjün ardından, rekombinant adeno-asosiye virüsler %40’lik katmandan toplandı ve aynı aşamalar rAAV-CAG-tdTomato için tekrarlandı.



Şekil 6.2.1. Virüs hazırlama basamakları. Beyin felcini takiben aksonal projeksiyonların takibinin yapılabilmesi için AAV vektörler 3 basamaklı bir hazırlık aşamasından geçmektedir.

6.2.1.4. Virüs enjeksiyonu

Beyin felci geçiren hayvanlar 3 gün süre ile dinlendirilip ardından daha önceden hazırlanmış olan eGFP ve tdTOMATO ile kodlanmış virüsler hayvanlara Bregma AP 0.5, lateral 2.00, 2,50 mm olacak şekilde her iki hemisfere 1.0 mm derinlikte, 45°'lik açılarla dört yerden cam pipet ile enjekte edildi (Şekil 6.2.1.4.1). Cam pipet 1 dk süre ile enjeksiyon bölgesinde bırakıldı. Her bir enjeksiyon bölgesine 400 nl virüs enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyondan 30 gün sonra sakrifiye edilen hayvanların beyinleri çıkartıldı ve RN ve FN bölgeleri (Şekil 6.2.1.4.2) beyin matirisi kullanılarak koronal kesitler alınarak ortaya çıkartıldı [155] ardından kesitlere şeffaflaştırma işlemi başlatıldı.



Şekil 6.2.1.4.2. Beyin Kesitlerinde RN ve FN konumları. Motor korteksten yapılan enjeksiyonların bütün beyin boyunca izlediği yol ve analizi yapılan RN ve FN bölgeleri.

6.3. Kullanılan şeffaflaştırma yöntemleri ve optimizasyon

Doku şeffaflaştırma yöntemlerinin optimizasyonu için ilk başta GFP-M transgenik hayvanların beyinlerinden alınan dokularda CLARITY ve 3DISCO olmak üzere 2 farklı doku şeffaflaştırma yöntemi denendi. Yapılan optimizasyonun ardından viral vektör uygulanan hayvanlara 3DISCO protokolleri uygulandı.

6.3.1. Clarity yöntemi ile şeffaflaştırma

Yetişkin fareler kloral hidrat ile anestezi edildi ve 4% paraformaldehid (PFA), 4% akrilamide, 0.05% bis-akrilamide, 0.25% VA044 ve tamponlu tuz çözeltisi (TTÇ) ile transkardiyak olarak perfüze edildi. Beyinler çıkartılıp 3 gün boyunca aynı solusyonda 4 °C'de inkübe edildi. Daha sonra polimerizasyon için solüsyon sıcaklığı

37 °C'ye çıkartıldı. 3 saat sonra 37 °C'de hidrojel gömülü beyinler organ-elektroforez haznesine konuldu. 4% (wt/vol) sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren sodyum borat solusyonu (200mM, pH 8.5) haznede dolaşırken, 10-60 V 2 gün boyunca 37-50 °C de beyine uygulandı. SDS'i gidermek için beyinler temizlemeden sonra 2 gün süreyle 37 °C'de TTÇ ile inkübe edildi. Beyinler 1 mm'lik bloklar halinde kesildi. Bloklar daha sonra temizlenmesi için 1 gün süreyle elektroforez yapıldı [156].

6.3.2. 3Disco yöntemi ile şeffaflaştırma

Hayvanlar letal doz kloral hidrat ile anesteziye alındı ve herhangi bir refleks gözlemlenmediği anda 5-10 dakika süre ile soğuk PBS ile kan tamamen vücuttan uzaklaşmaya kadar kardiyak perfüzyon yapıldı. Daha sonra dakikada 5 ml olacak şekilde toplamda 50 ml ve soğuk olarak %4'lük PFA ile perfüzyona devam edildi. Perfüzyonu takiben dikkatlice kafatası açılıp beyin bütün olarak dışarı çıkartıldı ve bir gece boyunca %4'lük PFA'da post-fiksasyona bırakıldı. Post-fiksasyon sonrasında dokular PFA artıklarından temizlenmesi için PBS ile 3x5 dakika süre ile yıkandı. PBS ile yıkanan dokular refraktif indeks ayarlayıcısı olarak ilk başta farklı konsantrasyonlarda tüm beyin dokusu için 12 saat arayla, 1 mm'lik dilimler için ise 2 saat arayla tetrahidrofuran (THF) serisinden geçirildi. THF serileri %50, 70, 80 olacak şekilde distile su ile karıştırılıp hazırlandı. Ayrıca son basamakta %100 THF ile muamele edilip sonrasında asıl şeffaflaştırma kimyasalı olan dibenzil etere (DBE) bırakıldı, şeffaflaştırmanın kalitesini arttırmak için her 10 dakika taze DBE konuldu (Tablo 5.3.2) [157].

Solüsyon	Beyin (kısa protokol)	Beyin (uzun protokol)
%50 (vol/vol) THF	2 saat	12 saat
%70 (vol/vol) THF	2 saat	12 saat
%80 (vol/vol) THF	2 saat	12 saat
%100 (vol/vol) THF	1 saat, geceboyu, 1 saat	3x12 saat
DBE	>3 saat	1-2 gün

Tablo 5.3.2.1. 3DISCO şeffaflaştırma protokolü. Kısa protokol 1 mm kalınlığındaki dokular için kullanılırken, uzun protokol bütün beyin şeffaflaştırmalarında kullanılmaktadır. Şeffaflığın kalitesini arttırmak için her 10 dakika taze DBE konulmalıdır.

6.4. Görüntüleme

Görüntüleme işleminin yapılabilmesi için öncelikle bir cam petri alınıp etrafı dental sement veya katı gliserin ile kaplandı ve içerisine şeffaflaştırma solusyonu olan DBE konuldu. Tam ortaya yerleştirilen beyinlerde görüntüleme işlemi Axio Zoom Stereo V12 Mikroskop (Zeiss GMBH), Lazer Taramalı Mikroskop (Zeiss GMBH) ve Multi-Foton Mikroskop (7MP Zeiss GMBH) ve Işık Perdeli Floresan Mikroskop (LaVision Biotech GMBH) yapıldı. Alınan 3 boyutlu görüntüler post-işlem programları ile tekrar organize edildi.

6.4.1. Axio zoom mikroskop

Axio Zoom mikroskop (AZM), dokulara geniş açıdan bakılmasını sağlayan ve 11X ila 40X arası büyötmeye sahip bir mikroskoptur. Hayvanlara uygulanan AVV viral vektörlerin motor korteks üzerinde hızlıca yoğunluklarının ölçülmesinde ve ne kadar bir alana yayıldığıının anlaşılmasında kullanıldı. Viral enfeksiyonun süresinin tayin edilmesi aşamasında dokuya uzaktan bakarak anatomik olarak virüsün ilerlemesi izlendi.

6.4.2. Lazer taramalı konfokal mikroskop

Lazer taramalı konfokal mikroskop (LTKM), normal opak dokularda ve kesitlerde maksimum 50 µm kalınlığındaki dokuların görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Ancak doku şeffaflaştırıldıktan sonra ışık geçirgenliği arttığından

dolayı daha kalın kesitlerde de görüntüleme yapılabilmektedir. Şeffaflaştırılan 1 mm'lik kesitlerin LTKM aracılığıyla görüntülemeleri yapıldı.

6.4.3. 2-foton mikroskop

2-Foton mikroskop (2FM) genellikle canlı hayvan görüntülemesinde ve daha kalın kesitlerin görüntülenmesinde kullanılan bir mikroskoptur. LTKM nazaran çok daha kalın numunelerden floresan işaretli örneklerin analiz edilmesinde kullanılır. Şeffaf beyin dokusunun tamamının görüntülenmesi 2FM aracılığıyla yapılabilmektedir. Ancak kullanılan femtosaniye lazerler bütün beyin dokusunun fotoğrafını çekmede hız olarak yetersiz kalmaktadır. İki farklı floresan işaretli bütün beyin dokusunun anteriyörden posteriyöre ve dorsalden ventrale tarama işlemi yaklaşık olarak üç ay sürmektedir. Sürenin bu kadar uzun olması hem dokudaki floresan işaretli hücrelerin solmasına, hem de sonuca ulaşılmasının gecikmesine yol açmaktadır.

6.4.4. Işık perdeli floresan mikroskop

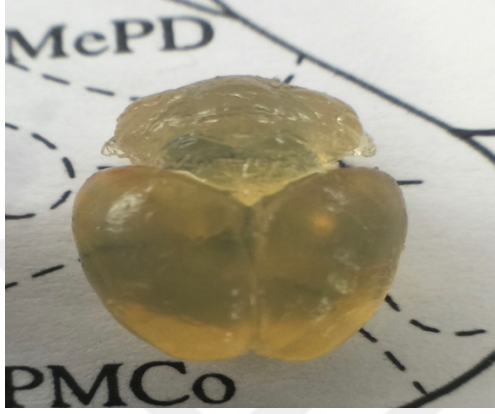
Işık perdeli floresan mikroskop (IPFM), çalışma prensibi olarak diğer lazer mikroskoplardan farklıdır. Özellikle şeffaflaştırılmış dokularda ışığın geçirgenliği kullanılarak çok daha derin bölgelere ulaşabilen bir sistemdir. Klasik mikroskoplarda tek bir objektif bulunurken, IPFM'lerde 3 objektif bulunmaktadır. Objektiflerden bir tanesi görüntü alınmasında kullanılırken, diğer ikisi karşılıklı olarak konumlandırılır. Karşılıklı birbirlerine bakan objektiflerin içerisinden geçen lazer objektiflerin arasında bir ışık huzmesi oluşturur. Bu şekilde şeffaf dokuların büyük bir kısmı eş zamanlı olarak görüntülenebilir. 2FM'lara nazaran görüntü alımı çok daha kısa sürmektedir. Bütün bir beyin görüntülemesi tek floresan işaret için 6.3X büyütmede yaklaşık olarak 3-4 saat sürmektedir.

6.5. İstatistik

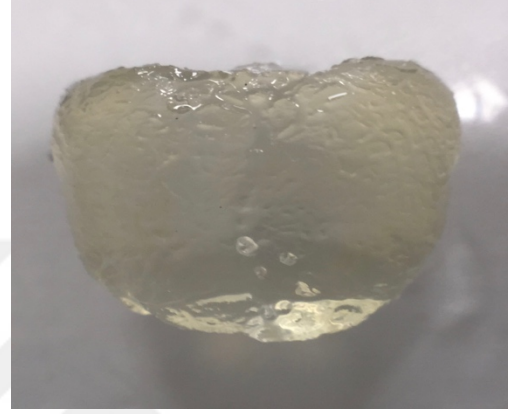
Gruplardaki hayvan sayısının belirlenmesinde Power Analiz programı kullanılmış olup çalışma için toplam 60 olarak bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla SPSS ANOVA istatistik analiz sistemi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılığı bulmak için independent T testi kullanıldı.

7. BULGULAR

Beyin felci geçiren hayvanların (n=20) beyinleri çıkartıldıktan sonra CLARITY ve 3DISCO olmak üzere 2 farklı şeffaflaştırma yöntemi denendi. Dokunun anatomik olarak özelliklerini koruyan ve floresan sinyallerin daha uzun süre kalıcı olabilen modelin 3DISCO modeli olduğu belirlendi (Resim 6.1).



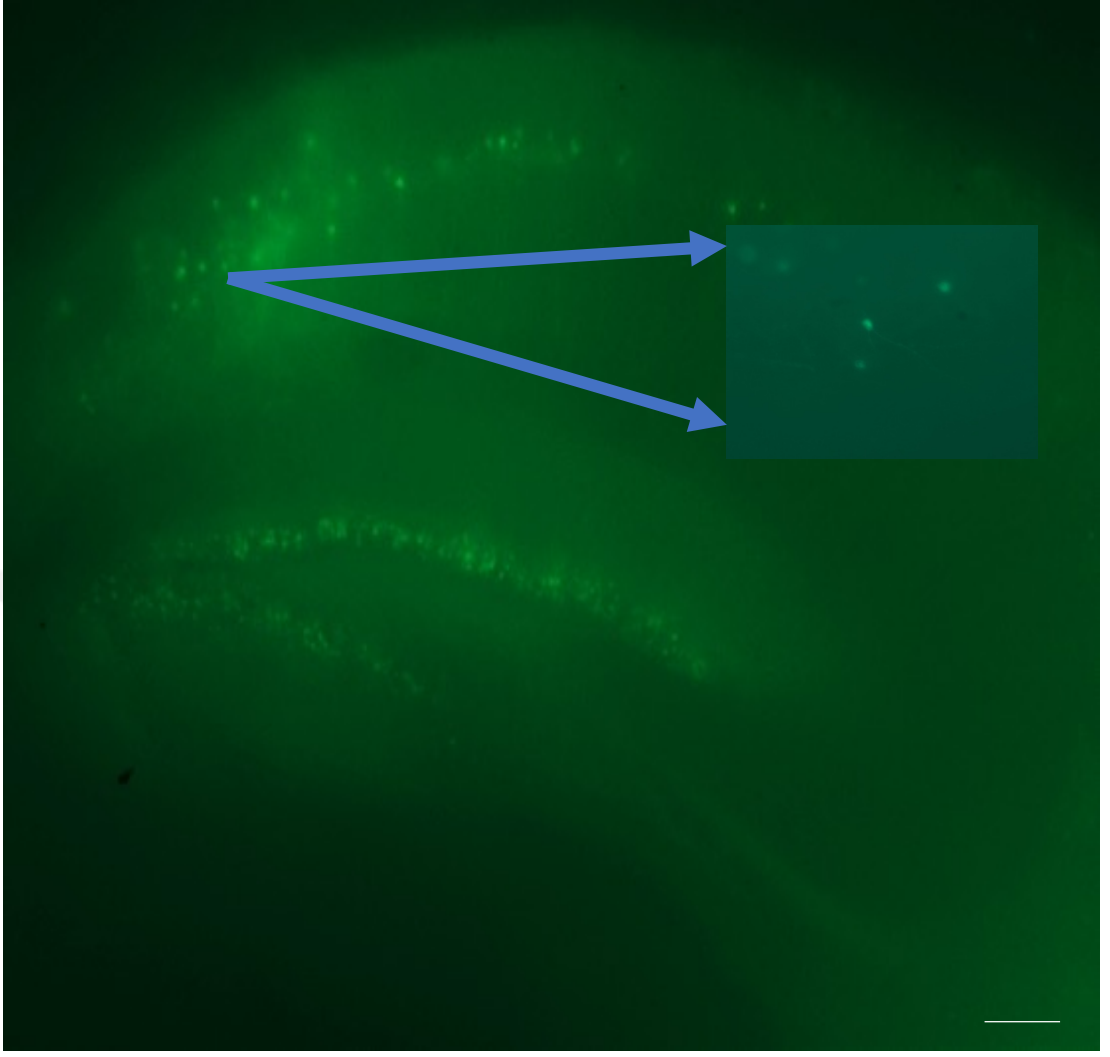
3DISCO



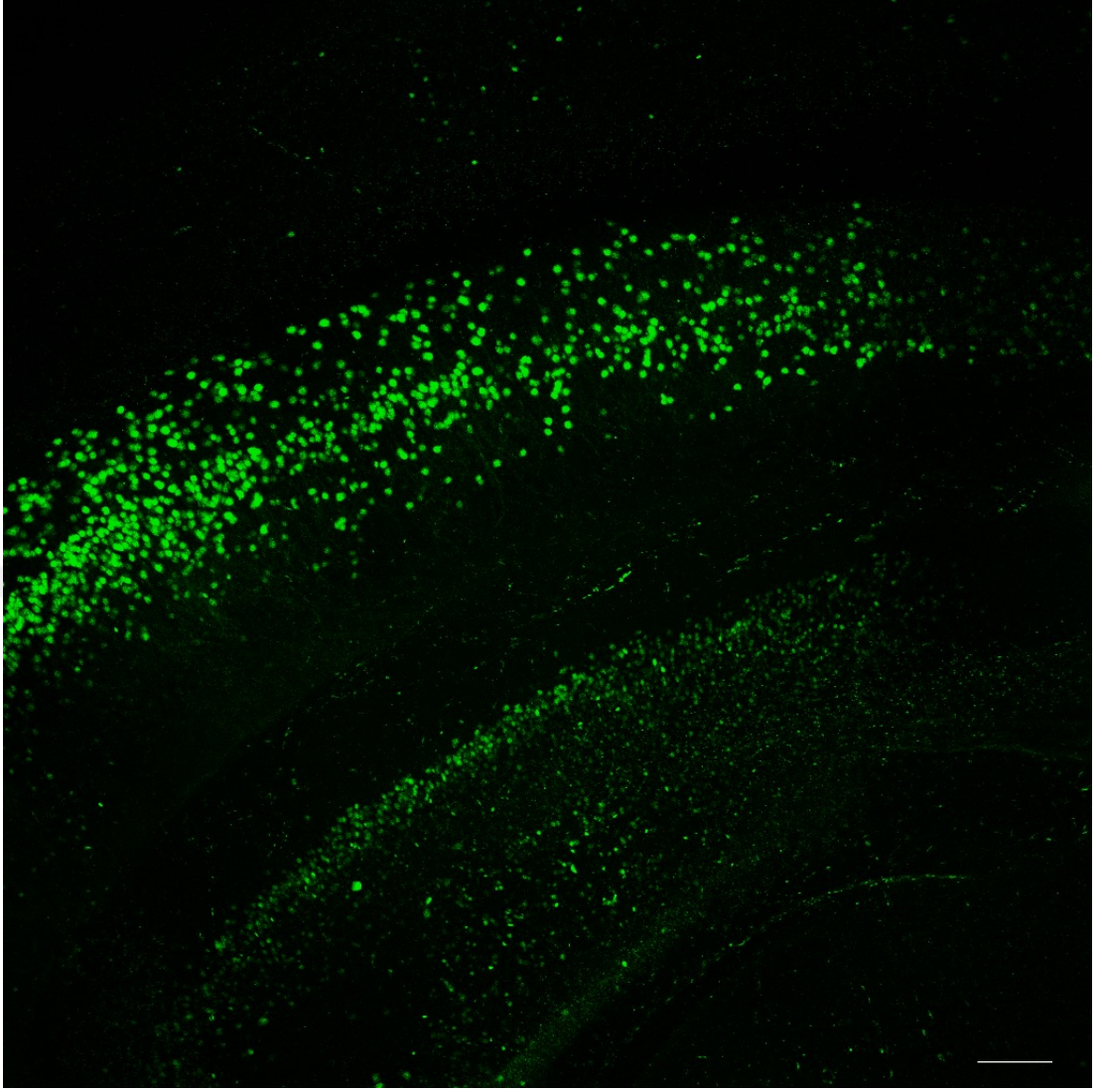
CLARITY

Resim 6.1. Bütün beyin dokusunda farklı şeffaflaştırma yöntemleri.

Doku şeffaflaştırma yöntemlerinin optimizasyonu için GFP-M transgenik hayvanlar kullanıldı. Sadece nöronlarından yeşil floresan üretimi yapan GFP-M hayvanlardan alınan 1 mm kalınlığındaki kesitler herhangi bir şeffaflaştırma protokolü uygulanmadan öncelikle 2FM ve LTKM altında görüntüleri çekildi. Alınan görüntülerde (Resim 6.2.) doku yüzeyinden ancak MFM mikroskopta 120 μ m, LTKM ise 58 μ m derinliğe inilebildiği görüldü. Sonrasında hayvanlardan alınan 1 mm kalınlığındaki kesitler 3DISCO protokolü uygulanarak kesilerek MFM altında üç boyutlu olarak hipokampus bölgesinin görüntüleri alındı (Şekil 6.3).

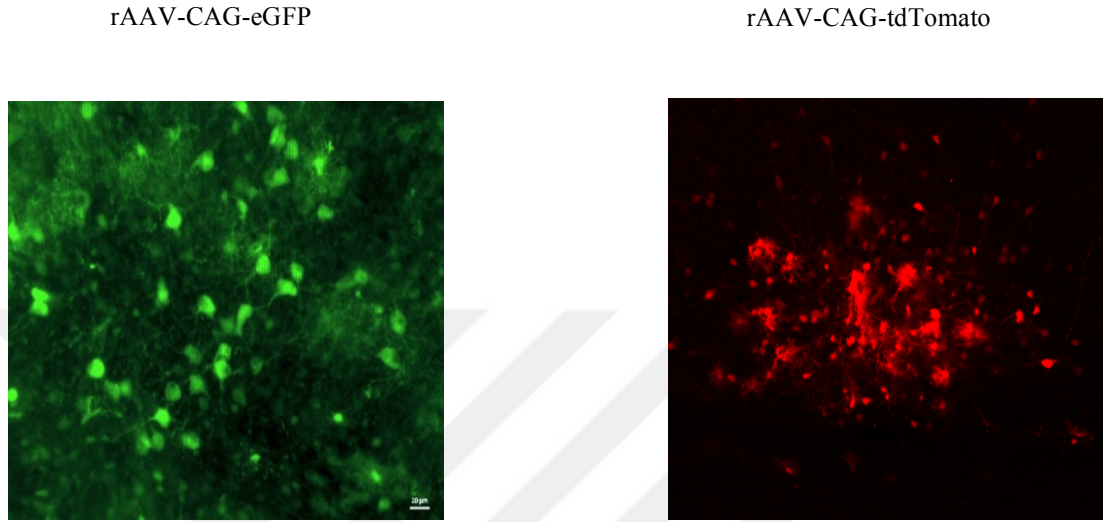


Resim 6.2. Transgenik GFP-M hayvanda 2-PM ve LTM görüntüleri. Şeffaflaştırma protokolü uygulanmadan önce alınan mikroskop görüntüleri.

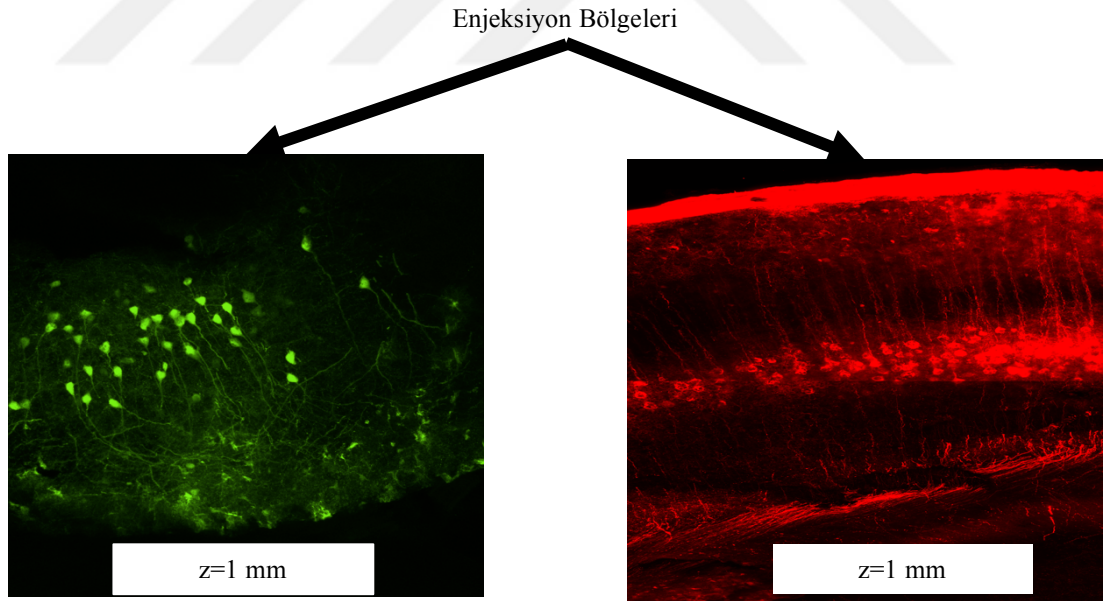


Resim 6.3. Tg GFP-M hayvanda şeffaflaşmış hipokampus bölgesi. Alınan 1 mm'lik hipokampus kesitlerinin üç boyutlu halden iki boyutlu hale getirilerek görüntüleri alındı.

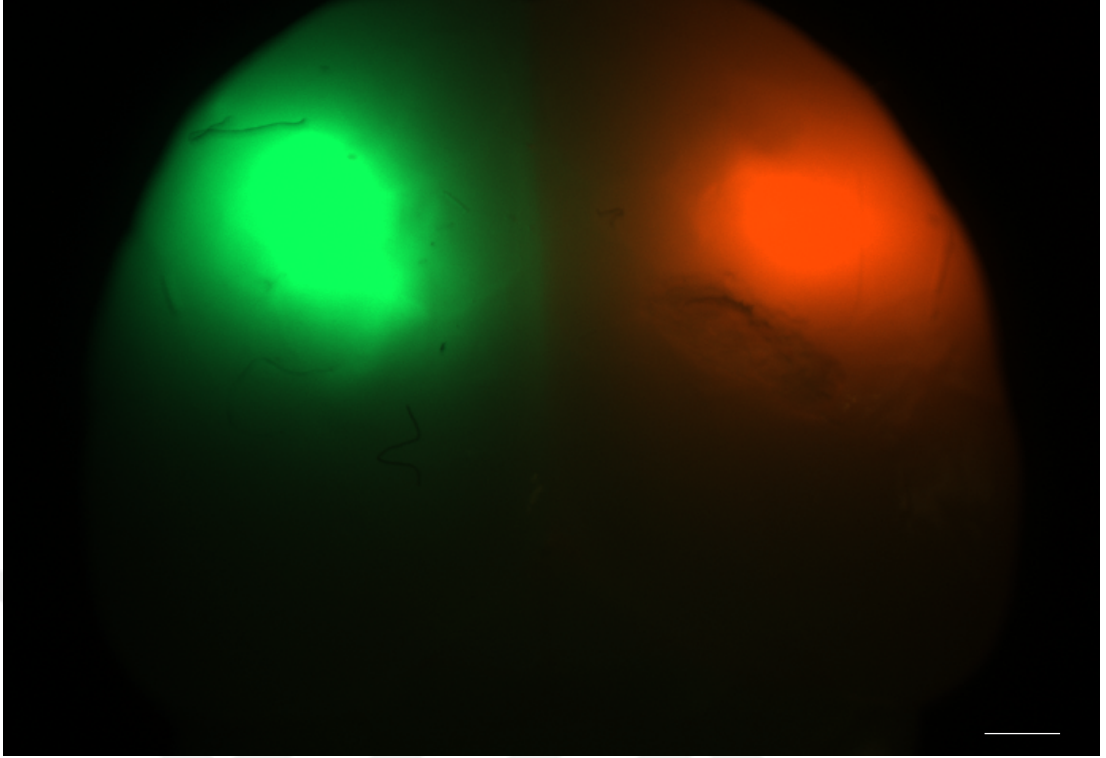
Virüs canlılığının optimizasyonu için ilk önce hücre kültürü çalışması yapıldı (Resim 6.4). Kullanılan virüslerin aktif oldukları anlaşıldıktan sonra virüslerin daha önceden belirtilen bölgelere enjeksiyonları yapıldı ve korteks bölgesindeki yayılımları izlendi (Şekil 6.5).



Resim 6.4. Hücre kültürü AAV görüntüleri.

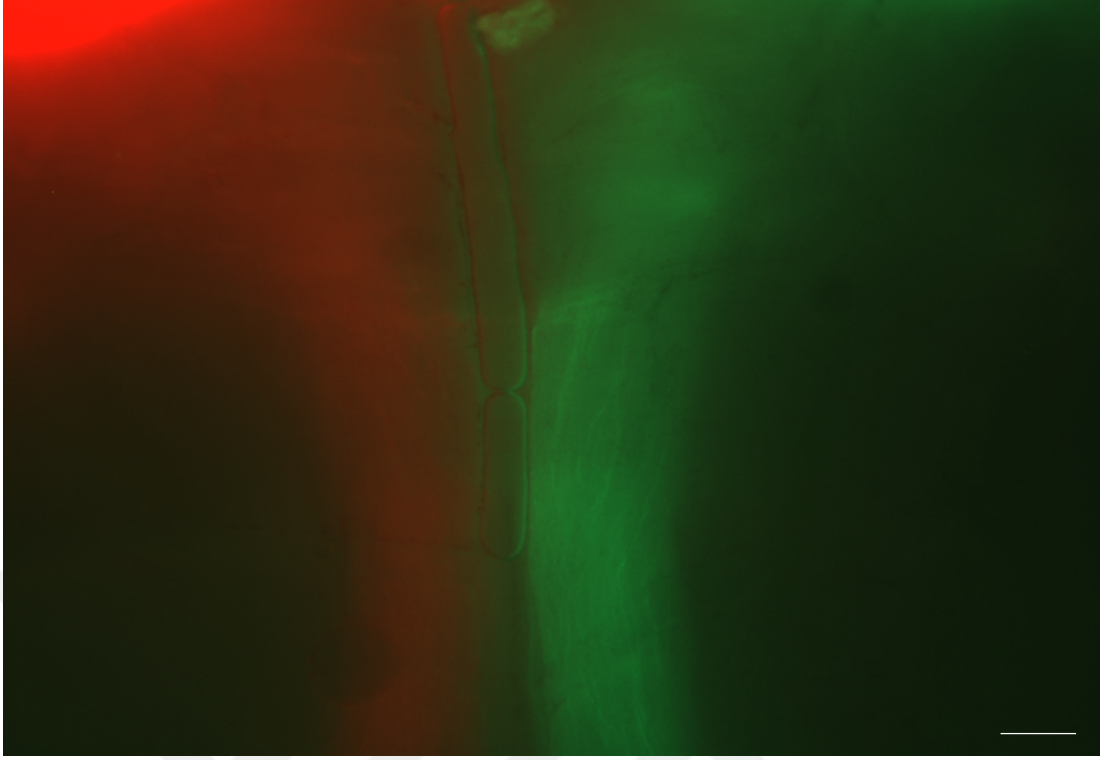


Resim 6.5. Enjeksiyon bölgeleri in vivo. Korteks bölgesine yapılan viral enjeksiyonların şeffaflaştırma sonrası AAV GFP ve AAV tdTOMATO hücrelerin enfekte oldukları görülmüştür.



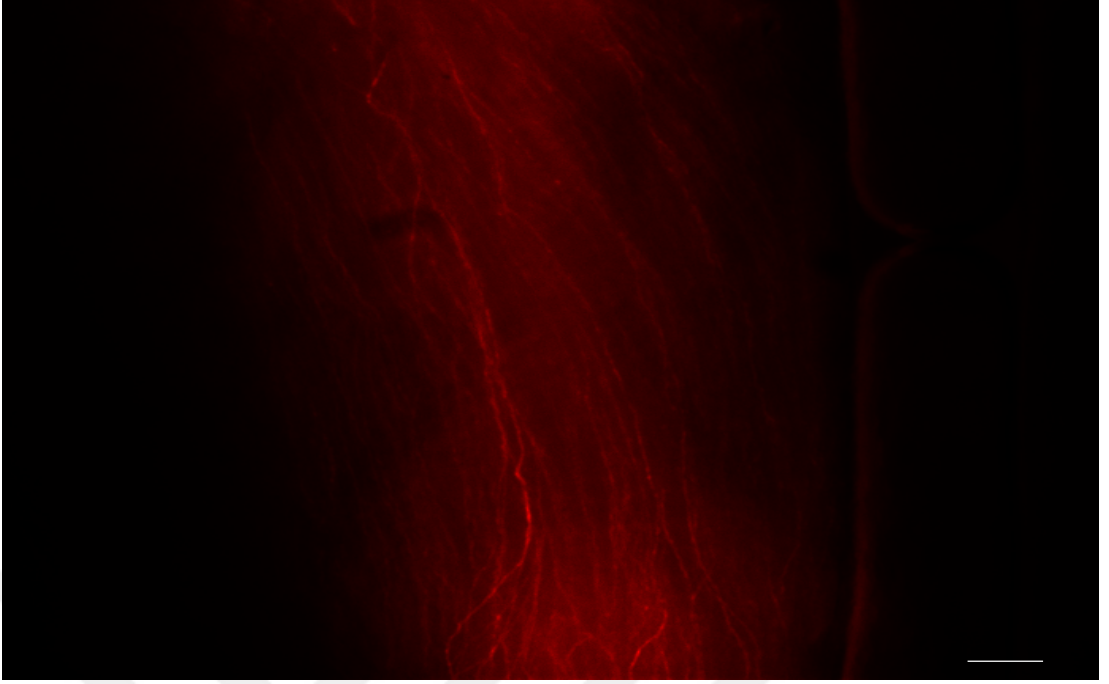
Resim 6.6. Virüs enjeksiyon bölgelerinin dorsal görünümü.

GFP ve tdTOMATO AAV vektörlerin hayvanların motor kortekslerine enjeksiyonunu takiben 30. günde hayvanlar sakrifiye edilerek beyinleri çıkartıldı ve herhangi bir şeffaflaştırma protokolü uygulanmadan Axio Zoom mikroskopta beynin dorsal kısmından ve ventral kısmından görüntüler alındı. Alınan görüntüler sonucunda AAV vektörlerin her iki hemisferde de yayıldığı ve enjeksiyonun doğruluğu saptandı (Resim 6.6).

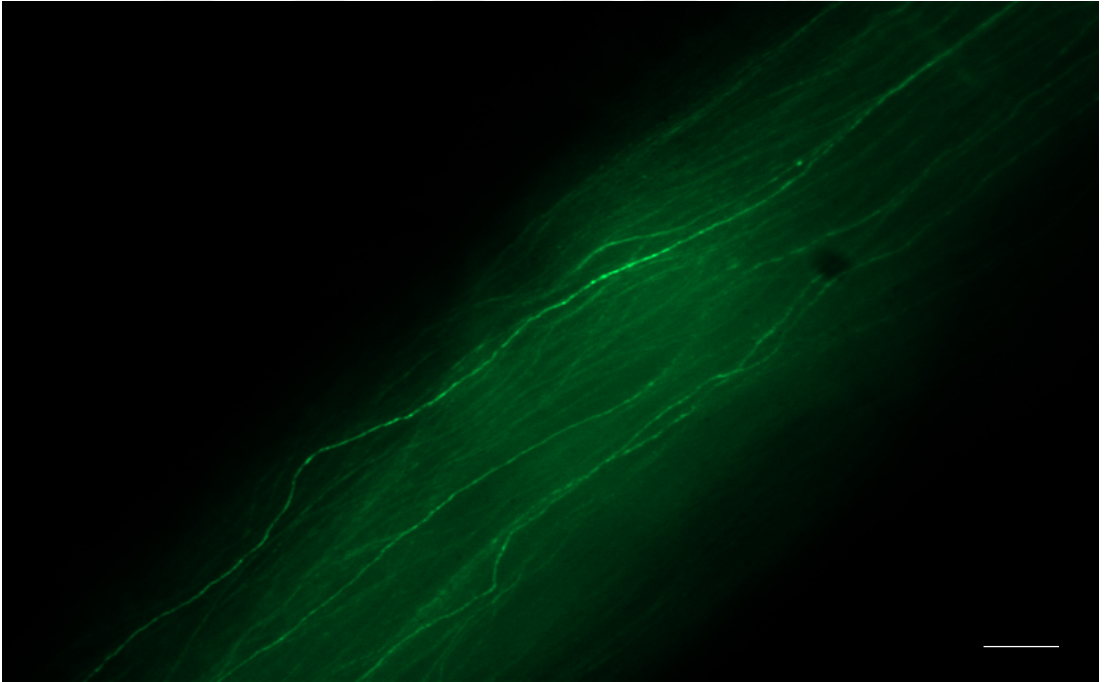


Resim 6.7. Virüs enjeksiyon bölgelerinin ventral görünümü.

AAV vektörlerin her iki hemisferde de motor korteksten başlayarak beynin ventraline doğru izlediği kortiko spinal yol Axio Zoom mikroskop kullanılarak izlendi. Enjeksiyonu takiben üç hafta içerisinde serebellum bölgesine ulaştığı saptandı (Resim 6.7). Serebellumun ventral bölgesinde mikroskopta büyütme yapılarak kortiko spinal yoldan gelen lifler daha ayrıntılı olarak görüldü (Resim 6.8, 6.9).

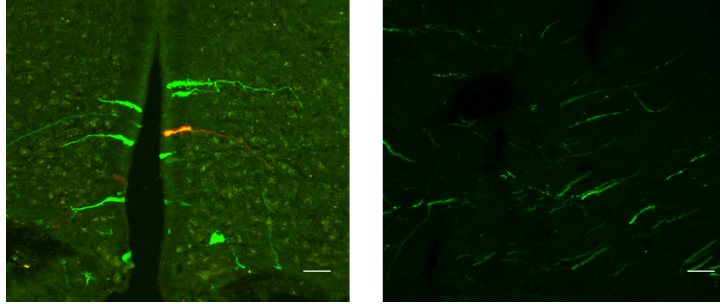


Resim 6.8. Viral vektörlerin enjeksiyonunun ardından serebellumun ventral görünümü tdTOMATO. Serebellumun ventral bölgesinden LTKM ile alınan görüntü.



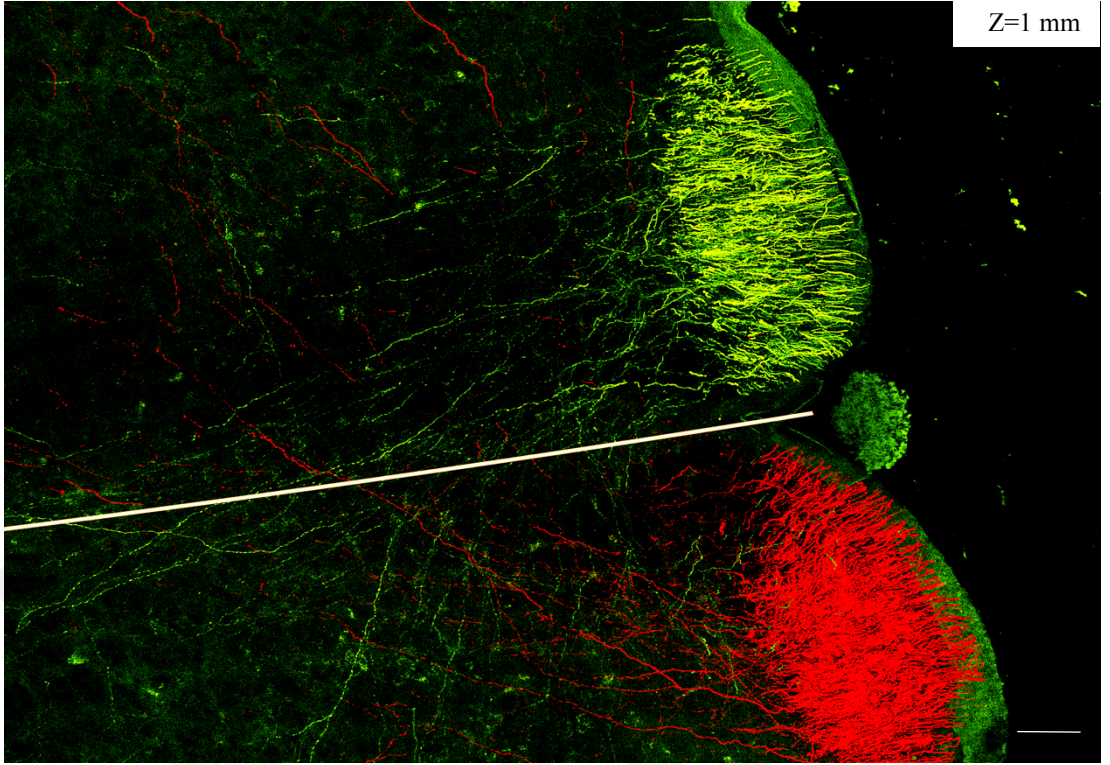
Resim 6.9. Viral vektörlerin enjeksiyonunun ardından serebellumun ventral görünümü GFP.

Enjeksiyon yapılan viral vektörlerin zamana bağlı olarak yapılan optimizasyonunda fasiyal çekirdek bölgesine ulaşmaları 3 hafta sürdüğü saptandı (Resim 6.10).

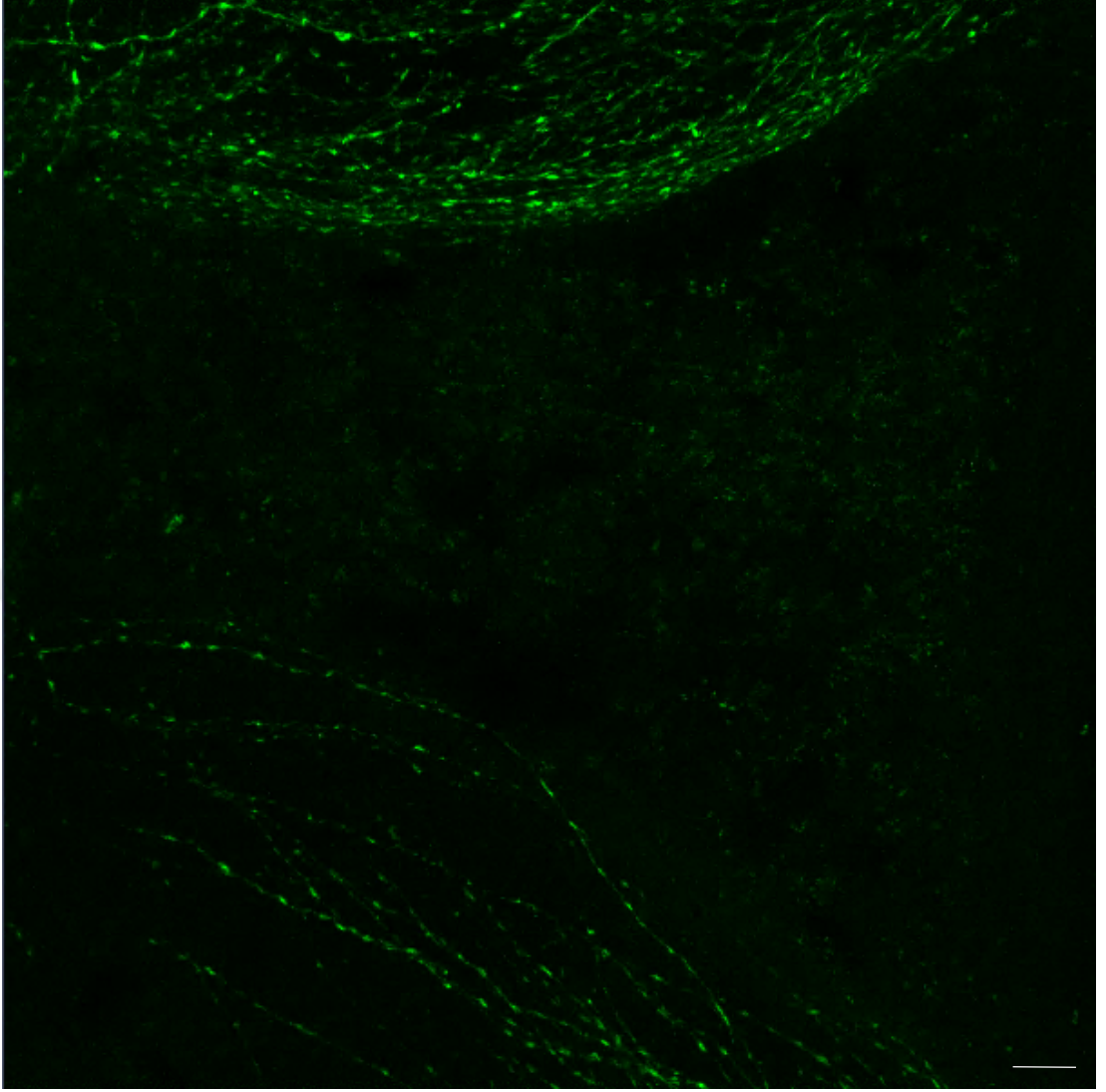


Resim 6.10. Viral optimizasyon görüntüleri.

Yapılan şeffaflaştırma optimizasyonlarının ardından hayvanların sağ ve sol hemisferlerine viral vektör enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyonları takiben 30. günde hayvanlar sakrifiye edilerek beyinleri çıkartıldı. Uygulanan 3DISCO protokolünün ardından kesitlerde RN ve FN bölgeleri hem 2FM hem de LTKM kullanılarak fotoğraflandı. Kontrol grubunda fasiyal çekirdek bölgesinde her iki hemisferden de karşılık olarak aksonal projeksiyonların geçişi izlendi (Resim 6.11, 6.12).

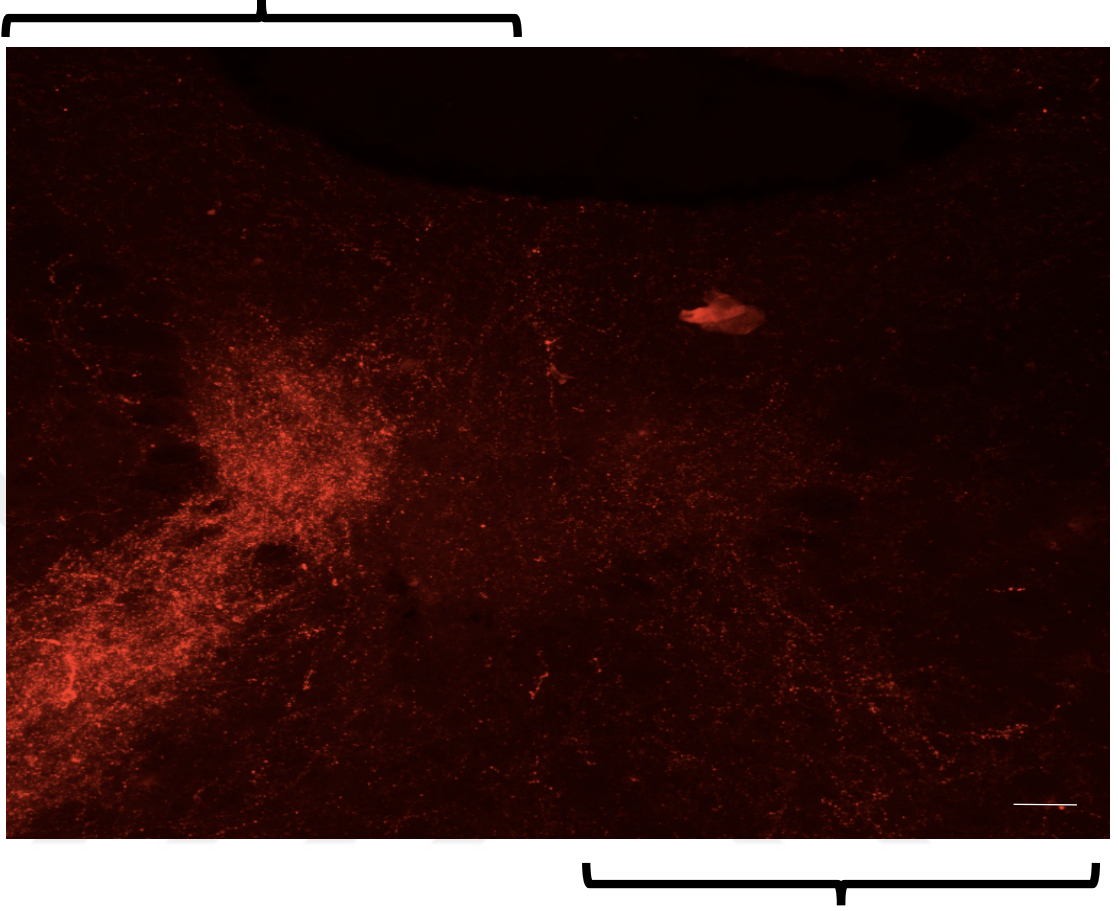


Resim 6.11. İskemi geçirmeyen hayvanda FN bölgesi aksonal projeksiyonları. Alınan 1 mm'lik kesitler şeffaflaştırıldıktan sonra görüntülemeleri yapıldı ve maksimum intensite projeksiyonları (MİP) alındı. Orta hat beyni dorsalden ventrale tam olarak ikiye bölmektedir.



Resim 6.12. RN bölgesindeki aksonal projeksiyonlar. Alınan 1 mm'lik kesitler şeffaflaştırıldıktan sonra görüntülemeleri yapıldı ve maksimum intensity projeksiyonları (MİP) alındı.

iskemik hemisfer

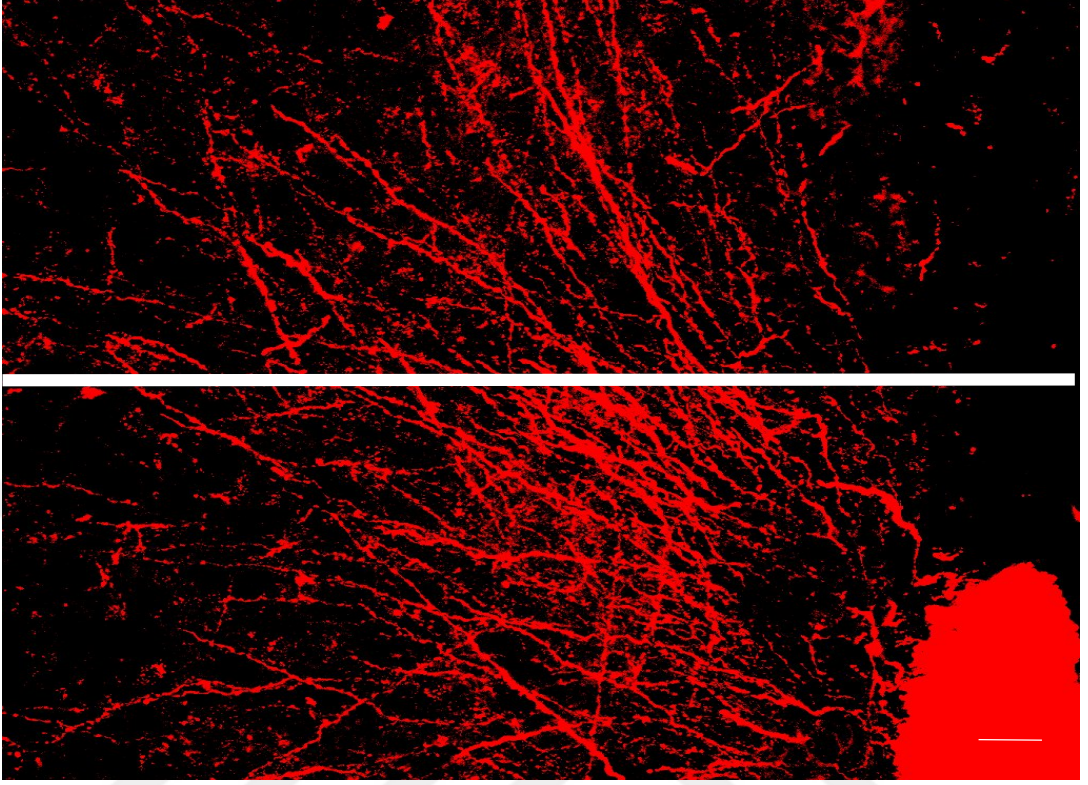


non-iskemik hemisfer

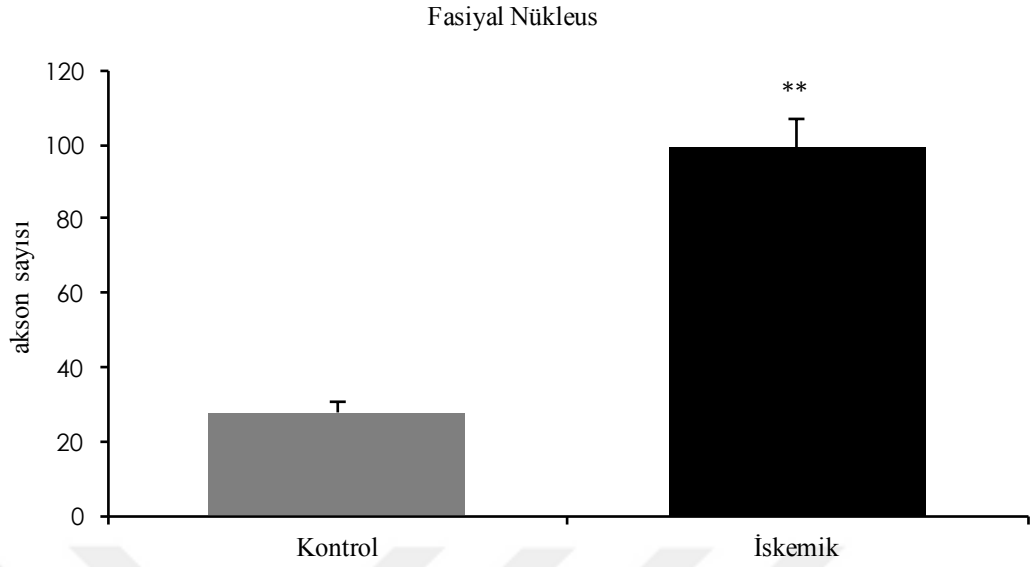
Resim 6.13. İskemi geçiren hayvanların RN bölgesindeki aksonal projeksiyonları. Görüntüler MİP olarak kaydedilmiştir.

Otuz dakikalık beyin felci geçiren hayvanlar 30 gün sonra sakrifiye edilip perfüzyon fiksasyon yapıldıktan sonra beyinleri alınıp 3DISCO yöntemi kullanılarak şeffaflaştırıldı. Alınan 1 mm'lik koronal kesitlerin 2FM altında görüntülenmesi yapıldı. Yapılan analiz sonucundan kontralateral alandan, ipsilateral bölgeye bol miktarda aksonal projeksiyonun olduğu gözlemlendi. Görüntüler MİP yapılarak kaydedildi (Resim 6.13, 6.14). Kontrol grubu ve beyin felci geçiren hayvanların fasiyal nükleus seviyesinde kontralateralden ipsilaterale geçen akson sayısı bakımından incelendiğinde kontrole göre yaklaşık dört kat daha fazla aksonun karşı hemisfere geçtiği tespit edildi (Şekil 6.1)

İskemik hemisfer



Resim 6.14. İskemik hayvanda FN bölgesindeki görüntüleri. Kontralateral bölgeden ipsilateral bölgeye geçen aksonların MİP görüntüleri. Orta hattın üzerinde kalan kısım ipsilateral, alt kısmında kalan bölge ise kontralateral alandır.

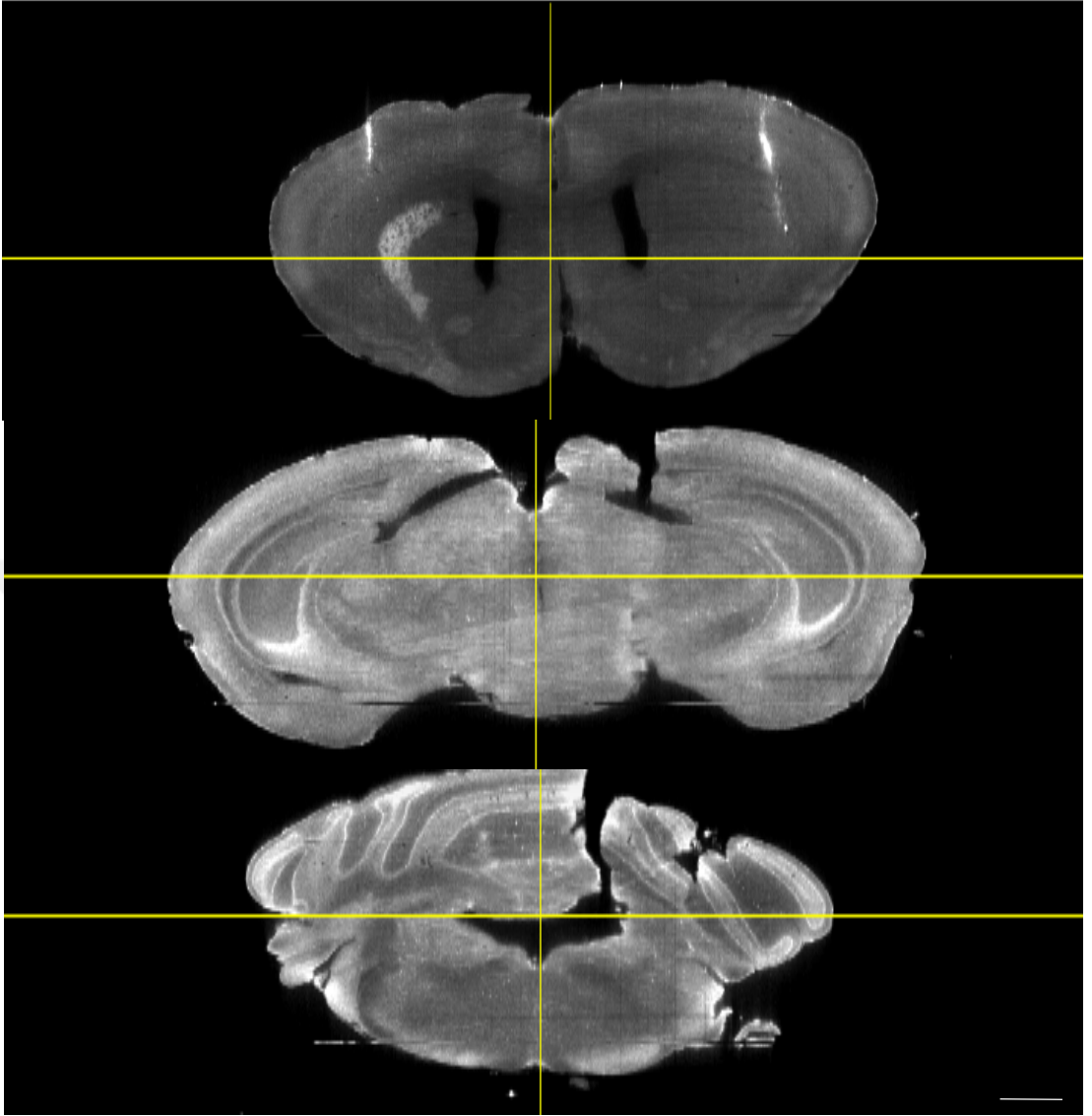


Şekil 6.1. Karşı hemisfere geçen akson sayıları. Beyin felci geçiren ve geçirmeyen hayvanlarda fasiyal nükleus bölgesinde kontralateralden ipsilaterale geçen akson sayıları. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ** $p < 0.05$.

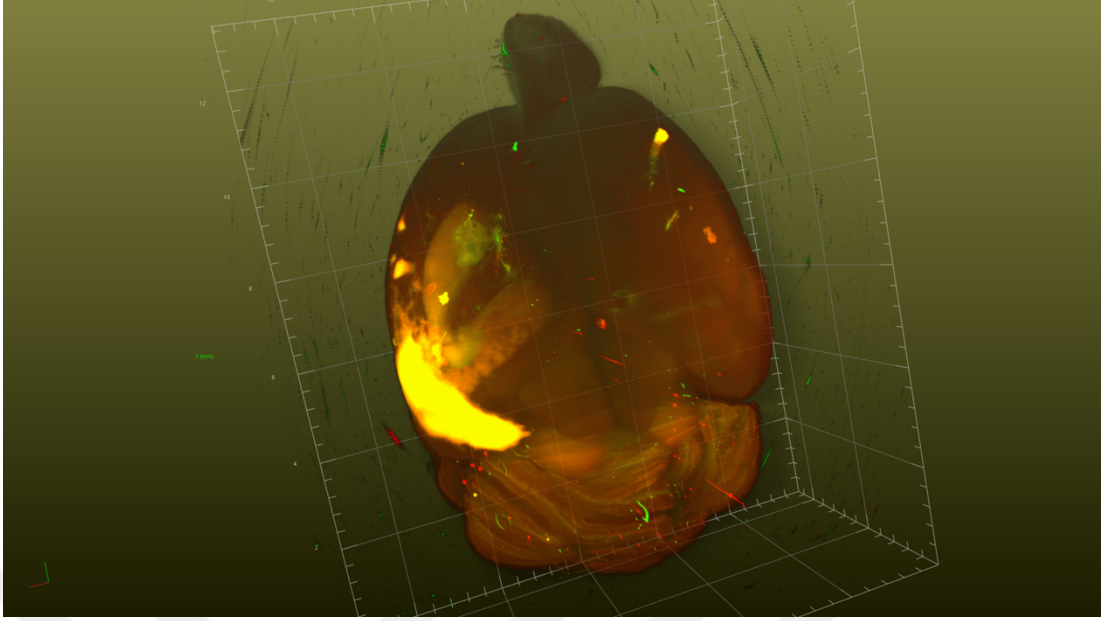
Beyin felci geçirmiş hayvanlardan alınan beyinlere 3DISCO protokolü uygulandı ve beyinlerin IPFM altında bütün olarak görüntüleri alındı. Alınan görüntüler Fiji programı ile analizleri yapıldı. Viral vektörlerin korteks bölgesinden beyin sapına kadar izlediği yol üç boyutlu olarak saptandı. Aynı şekilde IPFM ile alınan görüntüler Fiji programı ile 3 boyutlu hale getirilip hasar alanının hesaplanabileceği görüldü. Yapılan analiz sonucunda total beyin hacmi $350 \pm 9 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı. Hasar gören bölgenin alanı hesaplandığında ise $1.73 \pm 0.09 \text{ mm}^3$ olduğu görüldü. Ayrıca program özellikleri kullanılarak üç boyutlu dokunun ortogonal olarak görüntüleri alınarak hasar bölgesi, RN ve FN bölgeleri daha ayrıntılı olarak gözlemlendi (Resim 6.15, 6.16, 6.17).



Resim 6.15. IPFM ile alınan hasar bölgesi. Işık perdeli floresan mikroskop ile alınmış her kesitin 15 μm kalınlığındaki kesitlerden bir tanesi resimde gösterilmiştir.



Resim 6.16. IPFM ile alınan hasar bölgesi, RN ve FN bölgeleri.



Resim 6.17. IPFM ile alınan 3 boyutlu beyin görüntüsü. Alınan 15 μm 'lık kesitler birleştirildiğinde toplamda 5.37 mm kalınlığında tüm beyin görüntüsü 3 boyutlu olarak elde edilmiştir.

8. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada deneysel beyin felci sonrası plastisite gelişimindeki değişikliklerin ileri görüntüleme teknikleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için orta serebral arterin filament yöntemiyle 30 dakika tıkanması sonrası uzun dönemde plastisitede meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için motor korteks hücreleri floresan işaretli viral vektörlerle işaretlenerek üç boyutlu olarak ileri mikroskopi teknikleriyle incelenmiştir.

İskemiden günler sonra gerçekleşen kortikospinal yolaktaki aksonal filizlenmenin yani nöronal plastisitenin artan fonksiyonel geri kazanımla bağlantılı olduğu bilinmektedir. [158]. Bunun için fonksiyonel geri kazanımı test etmenin yanında plastisitenin nasıl gerçekleştiğini gösterebilmek için kortikospinal yolak boyunca aksonal uzamanın üç boyutlu olarak analiz edebilme tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda özellikle iskemi sonrası kontralateral alandan ipsilateral alana uzayan aksonların analizi sadece ince koronal kesitlerde iki boyutlu olarak yapılmaktadır. Bunun sonucunda da elde edilen bilgiler tam olarak gerçeği yansıtmaktansa çok dar bir alandaki aksonal projeksiyonları göstermektedir. Bu analizlerin kalın kesitlerde yapılamamasının bir nedeni de opak yapıdaki dokuların mikroskoplar aracılığıyla dokuya zarar vermeden görüntülenememesinden kaynaklanmaktadır. Kalın dokunun ileri mikroskopi teknikleri kullanılarak dahi görüntülenememesi i) kalın dokunun daha çok arka plan görüntüsü vermesi, ii) alınan arka plan görüntüsünün gerçek sinyali bastırması iii) biyolojik dokunun doğası gereği bulanık görünmesinden kaynaklanmaktadır [143]. Bu sorunun çözümü için şeffaflaştırma yönteminin kullanılabileceği 20. yüzyılın başlarında Splateholz ve ark. 2014 tarafından önerilmiştir. Ancak bu teknikleri kullanılan yoğun kimyasallar, dehidrasyon basamakları ve doku soldurma sebebiyle dokular zarar görmekte ve bir bütün halinde görüntülenememektedir. MFM teknolojisinin gelişmesiyle birlikte dokuya zarar vermeden daha derinden görüntü alınabilmesinin önü açılmıştır. Lazer taramalı mikroskopların gerek dokunun derinine inebilmesi gerek aynı anda farklı floresan işaretli moleküllerin tespit edilebilmesi gibi avantajları olsa da kendi içlerinde de bazı önemli farklarının olduğu bilinmektedir. Konfokal mikroskoplarda fazla kalın olmayan dokuların daha yüksek çözünürlükte

görüntü alınabildiği, 2FM’larda konfokale göre daha kalın örneklerin incelenemediği fakat büyük dokularda örneğin tüm beyin dokusunun görüntülenmesinde hız olarak dezavantajlı olduğu, LSKM ise derinlik açısından MFM’lara göre daha derine inemediği ve bütün beyin dokusunun çok daha hızlı görüntülediği bilinmektedir. Her ne kadar mikroskopi teknolojisi gelişmiş olsa da dokudan gelen otofloresanın minimize edilmesi amacıyla MFM görüntülenmesine uygun şeffaflaştırma teknikleri geliştirilmiştir. Bu tezde 2FM, LTKM ve IPFM kullanıldığı için şeffaflaştırma tekniği olarak CLARTY ve 3DISCO protokolleri denenmiş ve 3DISCO’nun mevcut görüntüleme imkanlarına göre daha uygun olduğu tespit edilmiştir. CLARTY protokolü uygulanan beyin dokusunun yapı olarak daha genişlemiş, yumuşak ve floresan işaretlerin uzun süre kalmaması, şeffaflaştırma basamaklarından kullanılan kimyasalların maliyetlerinin yüksek olması, içerdiği tuz solüsyonlarının korozyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu sebeplerle beyin felci sonrası aksonal uzamanın üç boyutlu analizinin yapılabilmesi için 3DISCO metodu kullanılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda beyin felci sonrası aksonal projeksiyonun görüntülenmesi amacıyla BDA ve CB gibi tracerler uygulanarak sonrasında alınan koronal kesitlere rutin immüno kimyasal veya immünfloresan teknikler kullanılmaktadır. Alınan kesitlerin ince olması sebebiyle yapılan analizler tüm beyin sonuçlarını yansıtmaktansa daha dar bir alanın sonucunu yansıtmaktadır [158, 159]. İmmüno kimyasal veya immünfloresan boyamalarda antikor antijen ilişkisi ile kullanıldığından beyin gibi kompleks dokularda kullanılan antikorların yanlış bölgeye bağlanması sonucu gerçeği yansıtmayan otofloresan harici ışımlar verebilir. Bununla birlikte kalın kesitlerde yüzeyden daha derindeki bölgelere antikor bağlanması on-onbeş gün gibi uzun inkübasyon süreleri gerektirdiğinden ve yeteri kadar derine penetre olamamasından dolayı son yıllarda antikor-antijen ilişkisini kullanan immünfloresan yerine floresan işaretli viral vektör kullanımı artmıştır. BDA veya CB’nun alternatifi olarak lazer taramalı mikroskoplarda görüntü alınabilmesi için dokuda floresan işaretli moleküllerin bulunması gerekmektedir. Literatürde bu tür mikroskoplarla alınan görüntülerin bulunduğu çalışmalarda büyük bir kısmının transgenik fare hatlarının kullanıldığı görülmüştür. Ancak beyin felci sonrası yeni oluşan aksonal projeksiyonların belirlenebilmesi için transgenik fare hatları kullanılamamaktadır. Dolayısıyla nöronların işaretlenmesi için motor korteks

bölgesine yeşil floresan ve kırmızı floresan protein ifade eden viral vektörler enjekte edilmiştir.

İskemi sonrası, kontralateral hemisferdeki hasarsız nöronların aksonlarını ipsilateral alana doğru uzattığı ve hasardan etkilenen duysal ve motor fonksiyonlara karşı duyarlı olduğu bilinmektedir [160, 161]. Yapılan bir çalışmada PirB ifade etmeyen hayvanlarda beyin felci sonrası yapılan plastisite analizinde kortikospinal yolaktan hasarsız motor korteksten red nükleus seviyesinde hasarlı alana doğru geçen akson sayısı ve uzunluğunda artış görülmüştür [158]. Literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan hedef molekül kadar tedavi zamanlamasının da önemli olduğu gösterilmiştir. [98, 162]. İskemi başlangıcından 24 saat içinde 5-GABAA reseptörünün inhibe edilmesi veya rehabilitasyon gibi geç dönemde yapılan tedavinin daha az etkili olduğu gösterilmiştir [70, 163].

Sonuç olarak beyin felci sonrası aksonal projeksiyonların belirlenebilmesi için öncelikle uygun olan şeffaflaştırma yöntemi GFP-M hayvanlar kullanılarak optimize edildi. Denenen şeffaflaştırma tekniklerinin içerisinde 3DISCO solvent bazlı tekniğin gerek süre açısından gerekse beyin dokusunun daha stabil olarak saklanabildiği gözlemlendi. Ayrıca bu şeffaflaştırma yönteminin floresan işaretli hücrelerin ve aksonların daha uzun korunduğu tespit edildi. Şeffaflaştırma tekniğinin optimizasyonunun ardından deney protokolünde uygulanan viral vektörlerin ne kadar süre sonunda red nükleus ve fasiyal nükleus bölgelerine ulaştığı tayin edilmiştir. Motor kortekse yapılan viral vektör enjeksiyonlarının 3 hafta ile 1 ay sonra istenilen bölgelere ulaştığı tespit edilmiştir. Daha sonra beyin felci yapılan hayvanlara operasyondan 3 gün sonra viral vektör enjeksiyonları yapıp 30. gün sakrifiye edilip 3DISCO şeffaflaştırma modeli uygulandı. Gerek süre gerekse değerlendirme açısından uygun doku kalınlığını belirleyebilmek için şeffaflaştırılan dokular gerek 1 mm kalınlığında gerekse bütün olarak görüntülendi. Lazer taramalı mikroskopta bütün beyin dokusunun görüntülenemediği ancak 1 mm'lik kesitlerin fotoğraflanabildiği ve çözünürlük olarak çok daha iyi olduğu gözlemlendi, buna rağmen süre olarak çok uzun zamanda görüntü alındığı saptandı. Multi foton mikroskoplarda 1 mm'den daha kalın dokuların analiz edilebildiği hız olarak lazer taramalı mikroskopa nazaran daha kısa sürede fotoğraf çektiği görüldü. Işık perdeli mikroskoplarda ise bütün beyin

dokusunun tek seferde ve süre olarak hem lazer taramalı mikroskoplara hem de multi foton mikroskoplara nazaran çok daha hızlı görüntü alınabildiği saptandı.

Bulduğumuz bu sonuçlar doğrultusunda şeffaflaştırma tekniğinin kullanılması ve bunun yanında viral vektör enjeksiyonlarının yapılması beyin felci patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, hasardan sonra meydana gelen plastisitenin kortiko spinal yolların daha iyi belirlenmesi ve son olarak geliştirilecek tedavi yöntemlerinin etkinliklerinin yorumlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



9. KAYNAKLAR

1. Bazan, N.G., V.L. Marcheselli, and K. Cole-Edwards, Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1053: p. 137-47. (2005)
2. Damodaran, T., et al., Time course of motor and cognitive functions after chronic cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res.* 275: p. 252-8. (2014)
3. Hofmeijer, J., et al., Mild hypoxia affects synaptic connectivity in cultured neuronal networks. *Brain Res.* 1557: p. 180-9. (2014)
4. Kamchatnov, P.R., O.V. Vorob'eva, and A.P. Rachin, [Treatment of emotional and cognitive disorders in patients with chronic cerebral ischemia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 114(4): p. 52-6. (2014)
5. Khatri, N. and H.Y. Man, Synaptic activity and bioenergy homeostasis: implications in brain trauma and neurodegenerative diseases. *Front Neurol.* 4: p. 199. (2013)
6. Neumann, J.T., et al., Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets.* 14(1): p. 20-35. (2013)
7. Park, H.A., et al., Bcl-xL is necessary for neurite outgrowth in hippocampal neurons. *Antioxid Redox Signal.* 22(2): p. 93-108. (2015)
8. Mozaffarian, D., et al., Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 131(4): p. e29-322. (2015)
9. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22(9): p. 391-7. (1999)
10. Martin, R.L., H.G. Lloyd, and A.I. Cowan, The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17(6): p. 251-7. (1994)
11. Hossmann, K.A., Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 8(3): p. 195-208. (1996)
12. Yamasaki, Y., et al., Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke.* 26(2): p. 318-22; discussion 322-3. (1995)
13. Sale, A., N. Berardi, and L. Maffei, Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 32(4): p. 233-9. (2009)
14. Calabresi, P., et al., Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol.* 2(10): p. 622-9. (2003)

15. Nakatomi, H., et al., Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 110(4): p. 429-41. (2002)
16. Arvidsson, A., et al., Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 8(9): p. 963-70. (2002)
17. Wieloch, T. and K. Nikolich, Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*. 16(3): p. 258-64. (2006)
18. Nudo, R.J., Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 14(1 Suppl): p. S57-76. (2003)
19. Nudo, R.J., E.J. Plautz, and S.B. Frost, Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*. 24(8): p. 1000-19. (2001)
20. Liao, J.K., Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol*. 16(6): p. 624-9. (2005)
21. Liu, X.S., et al., Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26(6): p. 787-96. (2006)
22. Ding, G., et al., MRI of combination treatment of embolic stroke in rat with rtPA and atorvastatin. *J Neurol Sci*. 246(1-2): p. 139-47. (2006)
23. Chen, J., et al., Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25(2): p. 281-90. (2005)
24. Wang, L., et al., Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 35(7): p. 1732-7. (2004)
25. Lu, D., et al., Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 22(9): p. 1011-7. (2005)
26. Zhang, R.L., et al., Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 83(7): p. 1213-9. (2006)
27. Meng, H., et al., Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci Lett*. 393(2-3): p. 97-101. (2006)

28. Chen, J., et al., N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres. *Neuroscience*. 140(2): p. 377-88. (2006)
29. Jiang, Q., et al., Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage*. 28(3): p. 698-707. (2005)
30. Zhang, C., et al., Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*. 141(2): p. 687-95. (2006)
31. Shen, L.H., et al., Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*. 137(2): p. 393-9. (2006)
32. Anderson, C.S., et al., Very long-term outcome after stroke in Auckland, New Zealand. *Stroke*. 35(8): p. 1920-4. (2004)
33. Biernaskie, J., G. Chernenko, and D. Corbett, Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci*. 24(5): p. 1245-54. (2004)
34. Papadopoulos, C.M., et al., Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol*. 51(4): p. 433-41. (2002)
35. Cramer, S.C., et al., A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke*. 28(12): p. 2518-27. (1997)
36. Wiessner, C., et al., Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23(2): p. 154-65. (2003)
37. van der Zijden, J.P., et al., Manganese-enhanced MRI of brain plasticity in relation to functional recovery after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(4): p. 832-40. (2008)
38. Musso, M., et al., Training-induced brain plasticity in aphasia. *Brain*. 122 (Pt 9): p. 1781-90. (1999)
39. Gerloff, C., et al., Multimodal imaging of brain reorganization in motor areas of the contralesional hemisphere of well recovered patients after capsular stroke. *Brain*. 129(Pt 3): p. 791-808. (2006)
40. Huerta, P.T. and B.T. Volpe, Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations. *J Neuroeng Rehabil*. 6: p. 7. (2009)
41. Zhao, J., et al., Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury. *J Neurosci*. 27(38): p. 10240-8. (2007)

42. Zador, Z., et al., Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol.* (190): p. 159-70. (2009)
43. Qiu, B., et al., Overexpression of aquaporin1 aggravates hippocampal damage in mouse traumatic brain injury models. *Mol Med Rep.* 9(3): p. 916-22. (2014)
44. Attwell, D. and S.B. Laughlin, An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21(10): p. 1133-45. (2001)
45. Symon, L., The relationship between CBF, evoked potentials and the clinical features in cerebral ischaemia. *Acta Neurol Scand Suppl.* 78: p. 175-90. (1980)
46. Astrup, J., B.K. Siesjo, and L. Symon, Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 12(6): p. 723-5. (1981)
47. Song, J., et al., PKA Inhibitor H89 (N-[2-p-bromocinnamylamino-ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) Attenuates Synaptic Dysfunction and Neuronal Cell Death following Ischemic Injury. *Neural Plast.* 2015: p. 374520. (2015)
48. Lo, E.H., M.A. Moskowitz, and T.P. Jacobs, Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke.* 36(2): p. 189-92. (2005)
49. Bano, D. and P. Nicotera, Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke.* 38(2 Suppl): p. 674-6. (2007)
50. Maggio, N., et al., Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *J Neurosci.* 28(3): p. 732-6. (2008)
51. Bushi, D., et al., Increased thrombin activity following reperfusion after ischemic stroke alters synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurochem.* 135(6): p. 1140-8. (2015)
52. Maggio, N., et al., Thrombin regulation of synaptic transmission: implications for seizure onset. *Neurobiol Dis.* 50: p. 171-8. (2013)
53. Xi, G., R.F. Keep, and J.T. Hoff, Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol.* 5(1): p. 53-63. (2006)
54. Murphy, T.H. and D. Corbett, Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 10(12): p. 861-72. (2009)
55. Fawcett, J.W., The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Prog Brain Res.* 218: p. 213-26. (2015)
56. Deidda, G., et al., Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. *Nat Neurosci.* 18(1): p. 87-96. (2015)

57. Pizzorusso, T., et al., Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 298(5596): p. 1248-51. (2002)
58. Bradbury, E.J., et al., Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*. 416(6881): p. 636-40. (2002)
59. Gherardini, L., M. Gennaro, and T. Pizzorusso, Perilesional treatment with chondroitinase ABC and motor training promote functional recovery after stroke in rats. *Cereb Cortex*. 25(1): p. 202-12. (2015)
60. Soleman, S., et al., Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. *Brain*. 135(Pt 4): p. 1210-23. (2012)
61. Alia, C., et al., Reducing GABAA-mediated inhibition improves forelimb motor function after focal cortical stroke in mice. *Sci Rep*. 6: p. 37823. (2016)
62. Hensch, T.K., Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. 6(11): p. 877-88. (2005)
63. Madden, K., W. Clark, and N. Lessov, Failure of ischemic neuroprotection by potentiators of gamma-aminobutyric acid. *Clin Med Res*. 1(2): p. 119-24. (2003)
64. Lazar, R.M., et al., GABAergic but not anti-cholinergic agents re-induce clinical deficits after stroke. *J Neurol Sci*. 292(1-2): p. 72-6. (2010)
65. Kim, Y.K., et al., Functional Recovery After Ischemic Stroke Is Associated With Reduced GABAergic Inhibition in the Cerebral Cortex: A GABA PET Study. *Neurorehabil Neural Repair*. 28(6): p. 576-83. (2014)
66. Farrant, M. and Z. Nusser, Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*. 6(3): p. 215-29. (2005)
67. Fritschy, J.M. and P. Panzanelli, GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *Eur J Neurosci*. 39(11): p. 1845-65. (2014)
68. Cherubini, E., Phasic GABAA-Mediated Inhibition, in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, et al., Editors. 2012: Bethesda (MD).
69. Schiene, K., et al., Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 16(5): p. 906-14. (1996)
70. Clarkson, A.N., et al., Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature*. 468(7321): p. 305-9. (2010)

71. Lake, E.M., et al., The effects of delayed reduction of tonic inhibition on ischemic lesion and sensorimotor function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 35(10): p. 1601-9. (2015)
72. Hiu, T., et al., Enhanced phasic GABA inhibition during the repair phase of stroke: a novel therapeutic target. *Brain.* 139(Pt 2): p. 468-80. (2016)
73. Fritschy, J.M., et al., Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett.* 249(2-3): p. 99-102. (1998)
74. Luddens, H. and W. Wisden, Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci.* 12(2): p. 49-51. (1991)
75. Clarkson, A.N., et al., AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke. *J Neurosci.* 31(10): p. 3766-75. (2011)
76. Lopez-Valdes, H.E., et al., Memantine enhances recovery from stroke. *Stroke.* 45(7): p. 2093-2100. (2014)
77. Berretta, A., Y.C. Tzeng, and A.N. Clarkson, Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert Rev Neurother.* 14(11): p. 1335-44. (2014)
78. Clarkson, A.N. and S.T. Carmichael, Cortical excitability and post-stroke recovery. *Biochem Soc Trans.* 37(Pt 6): p. 1412-4. (2009)
79. Fritsch, B., et al., Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron.* 66(2): p. 198-204. (2010)
80. Alilain, W.J., et al., Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature.* 475(7355): p. 196-200. (2011)
81. Freund, P., et al., Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med.* 12(7): p. 790-2. (2006)
82. Garcia-Alias, G., et al., Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci.* 12(9): p. 1145-51. (2009)
83. Maier, I.C., et al., Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain.* 132(Pt 6): p. 1426-40. (2009)
84. Wahl, A.S. and M.E. Schwab, Finding an optimal rehabilitation paradigm after stroke: enhancing fiber growth and training of the brain at the right moment. *Front Hum Neurosci.* 8: p. 381. (2014)

85. Caleo, M., Rehabilitation and plasticity following stroke: Insights from rodent models. *Neuroscience*. 311: p. 180-94. (2015)
86. Carmichael, S.T., et al., New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis*. 8(5): p. 910-22. (2001)
87. Li, S., et al., An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci*. 13(12): p. 1496-504. (2010)
88. Overman, J.J., 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(33): p. E2230-9. (2012)
89. Brown, C.E., et al., 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(6): p. 1719-34. (2009)
90. Dancause, N., et al., Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci*. 25(44): p. 10167-79. (2005)
91. Clarkson, A.N., et al., Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 33(5): p. 716-23. (2013)
92. Benowitz, L.I. and S.T. Carmichael, Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis*. 37(2): p. 259-66. (2010)
93. Lindau, N.T., et al., Rewiring of the corticospinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy. *Brain*. 137(Pt 3): p. 739-56. (2014)
94. Morecraft, R.J., et al., Frontal and frontoparietal injury differentially affect the ipsilateral corticospinal projection from the nonlesioned hemisphere in monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol*. 524(2): p. 380-407. (2016)
95. Carmichael, S.T. and M.F. Chesselet, Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci*. 22(14): p. 6062-70. (2002)
96. Riban, V. and M.F. Chesselet, Region-specific sprouting of crossed corticofugal fibers after unilateral cortical lesions in adult mice. *Exp Neurol*. 197(2): p. 451-7. (2006)
97. Szele, F.G., C. Alexander, and M.F. Chesselet, Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci*. 15(6): p. 4429-48. (1995)

98. Wahl, A.S., et al., Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science*. 344(6189): p. 1250-5. (2014)
99. Allred, R.P. and T.A. Jones, Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Exp Neurol*. 210(1): p. 172-81. (2008)
100. Allred, R.P., et al., Training the "less-affected" forelimb after unilateral cortical infarcts interferes with functional recovery of the impaired forelimb in rats. *Restor Neurol Neurosci*. 23(5-6): p. 297-302. (2005)
101. Kim, S.Y., et al., Experience with the "good" limb induces aberrant synaptic plasticity in the perilesion cortex after stroke. *J Neurosci*. 35(22): p. 8604-10. (2015)
102. Mansoori, B.K., et al., Acute inactivation of the contralesional hemisphere for longer durations improves recovery after cortical injury. *Exp Neurol*. 254: p. 18-28. (2014)
103. Glaser, J.R. and E.M. Glaser, Neuron imaging with Neurolucida--a PC-based system for image combining microscopy. *Comput Med Imaging Graph*. 14(5): p. 307-17. (1990)
104. Ascoli, G.A., Passive dendritic integration heavily affects spiking dynamics of recurrent networks. *Neural Netw*. 16(5-6): p. 657-63. (2003)
105. Euler, T. and W. Denk, Dendritic processing. *Curr Opin Neurobiol*. 11(4): p. 415-22. (2001)
106. Hausser, M. and B. Mel, Dendrites: bug or feature? *Curr Opin Neurobiol*. 13(3): p. 372-83. (2003)
107. Koch, C. and I. Segev, The role of single neurons in information processing. *Nat Neurosci*. 3 Suppl: p. 1171-7. (2000)
108. Krichmar, J.L., et al., Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: a simulation study. *Brain Res*. 941(1-2): p. 11-28. (2002)
109. Mainen, Z.F. and T.J. Sejnowski, Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*. 382(6589): p. 363-6. (1996)
110. Vetter, P., A. Roth, and M. Hausser, Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol*. 85(2): p. 926-37. (2001)
111. Connors, B.W. and M.J. Gutnick, Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci*. 13(3): p. 99-104. (1990)

112. Mason, A. and A. Larkman, Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci.* 10(5): p. 1415-28. (1990)
113. Yang, C.R., J.K. Seamans, and N. Gorelova, Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci.* 16(5): p. 1904-21. (1996)
114. Feng, G., et al., Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron.* 28(1): p. 41-51. (2000)
115. Fuhrmann, M., et al., Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci.* 27(23): p. 6224-33. (2007)
116. Livet, J., et al., Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 450(7166): p. 56-62. (2007)
117. Shahani, N., et al., Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci.* 26(22): p. 6103-14. (2006)
118. Boldogkoi, Z., et al., Novel tracing paradigms--genetically engineered herpesviruses as tools for mapping functional circuits within the CNS: present status and future prospects. *Prog Neurobiol.* 72(6): p. 417-45. (2004)
119. Koester, H.J. and D. Johnston, Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses. *Science.* 308(5723): p. 863-6. (2005)
120. Vandecasteele, M., J. Glowinski, and L. Venance, Electrical synapses between dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci.* 25(2): p. 291-8. (2005)
121. Benavides-Piccione, R., J.I. Arellano, and J. DeFelipe, Catecholaminergic innervation of pyramidal neurons in the human temporal cortex. *Cereb Cortex.* 15(10): p. 1584-91. (2005)
122. Wouterlood, F.G., et al., Double-label confocal laser-scanning microscopy, image restoration, and real-time three-dimensional reconstruction to study axons in the central nervous system and their contacts with target neurons. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 10(1): p. 85-95. (2002)
123. Zong, H., et al., Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell.* 121(3): p. 479-92. (2005)
124. Gan, W.B., et al., Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron.* 27(2): p. 219-25. (2000)

125. Rodriguez, A., et al., Automated reconstruction of three-dimensional neuronal morphology from laser scanning microscopy images. *Methods*. 30(1): p. 94-105. (2003)
126. Becker, K., et al., Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One*. 7(3): p. e33916. (2012)
127. Dodt, H.U., et al., Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*. 4(4): p. 331-6. (2007)
128. Erturk, A., et al., Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*. 7(11): p. 1983-95. (2012)
129. Renier, N., et al., iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 159(4): p. 896-910. (2014)
130. Steinke, H. and W. Wolff, A modified Spalteholz technique with preservation of the histology. *Ann Anat*. 183(1): p. 91-5. (2001)
131. Chung, K., et al., Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 497(7449): p. 332-7. (2013)
132. Tomer, R., et al., Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*. 9(7): p. 1682-97. (2014)
133. Yang, B., et al., Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*. 158(4): p. 945-58. (2014)
134. Chen, F., P.W. Tillberg, and E.S. Boyden, Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*. 347(6221): p. 543-8. (2015)
135. Conchello, J.A. and J.W. Lichtman, Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*. 2(12): p. 920-31. (2005)
136. Mertz, J., Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat Methods*. 8(10): p. 811-9. (2011)
137. Reynaud, E.G., et al., Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage. *HFSP J*. 2(5): p. 266-75. (2008)
138. Martell, J.D., et al., Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol*. 30(11): p. 1143-8. (2012)
139. Boyde, A., Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy. *Science*. 230(4731): p. 1270-2. (1985)

140. Marques, M.J., J.A. Conchello, and J.W. Lichtman, From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci.* 20(10): p. 3663-75. (2000)
141. Theer, P. and W. Denk, On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 23(12): p. 3139-49. (2006)
142. Theer, P., M.T. Hasan, and W. Denk, Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett.* 28(12): p. 1022-4. (2003)
143. Richardson, D.S. and J.W. Lichtman, Clarifying Tissue Clearing. *Cell.* 162(2): p. 246-57. (2015)
144. Holekamp, T.F., D. Turaga, and T.E. Holy, Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron.* 57(5): p. 661-72. (2008)
145. Wu, Y., et al., Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy. *Nat Biotechnol.* 31(11): p. 1032-8. (2013)
146. Planchon, T.A., et al., Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nat Methods.* 8(5): p. 417-23. (2011)
147. Chen, B.C., et al., Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science.* 346(6208): p. 1257998. (2014)
148. Bouchard, M.B., et al., Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high speed volumetric imaging of behaving organisms. *Nat Photonics.* 9(2): p. 113-119. (2015)
149. Susaki, E.A., et al., Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell.* 157(3): p. 726-39. (2014)
150. Verveer, P.J., et al., High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nat Methods.* 4(4): p. 311-3. (2007)
151. Chan, P.H., Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 27(6): p. 1124-9. (1996)
152. Lopez-Burillo, S., et al., Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J Pineal Res.* 34(4): p. 269-77. (2003)

153. Martin, M., et al., Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14(12): p. 1677-9. (2000)
154. Gray, S.J., et al., Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in in vitro and in vivo administration. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 4: p. Unit 4 17. (2011)
155. Kilic, E., et al., HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 8: p. 422. (2014)
156. Chung, K. and K. Deisseroth, CLARITY for mapping the nervous system. *Nat Methods.* 10(6): p. 508-13. (2013)
157. Erturk, A., D. Lafkas, and C. Chalouni, Imaging cleared intact biological systems at a cellular level by 3DISCO. *J Vis Exp.* (89). (2014)
158. Adelson, J.D., et al., Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB. *Neuron.* 73(6): p. 1100-7. (2012)
159. Wang, Y.C., et al., Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralesional brain plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 37(3): p. 980-993. (2017)
160. Lee, J.K., et al., Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci.* 24(27): p. 6209-17. (2004)
161. Netz, J., T. Lammers, and V. Homberg, Reorganization of motor output in the non-affected hemisphere after stroke. *Brain.* 120 (Pt 9): p. 1579-86. (1997)
162. Krakauer, J.W., et al., Getting neurorehabilitation right: what can be learned from animal models? *Neurorehabil Neural Repair.* 26(8): p. 923-31. (2012)
163. Paolucci, S., et al., Early versus delayed inpatient stroke rehabilitation: a matched comparison conducted in Italy. *Arch Phys Med Rehabil.* 81(6): p. 695-700. (2000)

10.ETİK KURUL ONAYI



**T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.34036
Konu : Etik Kurulu Hk.

27/09/2017

Sayın Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.02.2017 tarihli 04 karar no ile onay verilen "Beyin Felci Sonrası Meydana Gelen Plastisite İle İlgili Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopi Ve Moleküler Teknikler İle İncelenmesi" isimli çalışma başlığının "Beyin Felci Sonrası Meydana Gelen Plastisite İle İlgili Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopi Teknikleri İle İncelenmesi" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 27.09.2017 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 729D8B8DX7 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
16/02/2017	04		Taha KELEŞTEMUR

“Beyin Felci Sonrası Meydana Gelen Plastisite ile ilgili Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopi ve Moleküler Teknikler ile İncelenmesi” Başlıklı Bilimsel Araştırma Etik Kurulumuzda Görüşülmüş Olup, Çalışmanın Etik Kurallara Uygun Olduğuna “Oybirliği” ile Karar Verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 10 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Taha	Soyadı	Keleştemur
Doğum Yeri	Kayseri	Doğum Tarihi	21.03.1984
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	37630254640
E-mail	tkelestemur@medipol.edu.tr	Tel	533 638 93 80

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Doktora/Uzmanlık	Necmettin Erbakan Üniversitesi	-
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2009
Lise	Aydınlık Evler Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2014 -
2.	Biyolog	İstanbul Medipol Üniversitesi	2013
3.	Fizyoloji Asistanı	Yeditepe Üniversitesi	2010 - 2013

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	55							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi
Adobe Photoshop	Orta

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/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. 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.
4. 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.
5. **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.
6. 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.
7. 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.

Uluslararası Bildiriler

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. Poster- Kilic U, Beker MC, Caglayan AB, Elibol B, Karakas M, Altug B, Gok O, **Kelestemur T**, Kilic E, “Melatonin promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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 transaction 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- 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
5. 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.
6. Poster- **Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. 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.

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası
2. Zeiss ileri mikroskopi teknikleri

Ödüller

1. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Poster Birincilik Ödülü
2. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi Sözlü Sunum 1.'lik Ödülü Sakarya 2017
3. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi Poster 1.'lik Ödülü Konya 2015

