



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REPETATİF TRANSKRANİYAL MANYETİK STİMÜLASYONUN (rTMS)  
BEYİN FELCİ SONRASI HASARA ETKİSİ**

ZEYNEP BALÇIKANLI

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2018

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji  
Tez Sahibi : Zeynep BALÇIKANLI  
Tez Başlığı : Repetatif Transkronijal Manyetik Stimulasyonu(rTMS)  
Beyin Felci Sonrası Hasara Etkisi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 11.01.2018

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

### Danışman

Prof.Dr.Ertuğrul KILIÇ

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza



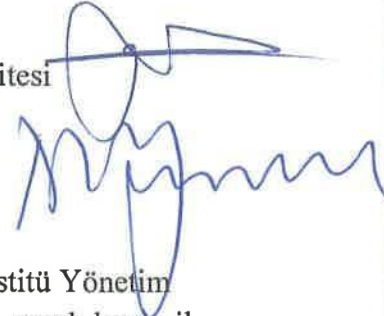
### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr.Bayram YILMAZ

Yeditepe Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17./01./ 2018 tarih ve 2018.../03... - 11... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

Bu tez çalışmasının 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 ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak göstermektedirğimi 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.

ZEYNEP BALÇIKANLI



“Bu tez  
aileme ithaf edilmiştir...”

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar destek olan, her konuda yardımını esirgemeyen, rehberlik eden danışmanım sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en derin minnetarlığımı sunuyorum. İstanbul Medipol Üniversitesi REMER araştırma merkezinde her türlü araştırma ve deney imkanından yararlanmamızı sağlayan sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunuyorum. Sayın Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen, A. Burak ÇAĞLAYAN ve M. Çağlar BEKER'e teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, bu tez sürecinde desteklerini esirgemeyen, Taha KELEŞTEMUR, Berrak ÇAĞLAYAN, Esra YALÇIN'a, birlikte çalışmaya başladığım günden itibaren her konuda yardımcı olan Serdar ALTUNAY'a, desteklerini esirgemeyen Aysun DİLDEN, Elif SERTEL, Reyda KARAÇAY, Nilay ATEŞ, Arman DALAY ve M.Özgen ALTINTAŞ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Her konuda yardımlarını esirgemeyen MEDİTAM ekibine; Ekrem M. ÖZDEMİR, Ali ŞENBAHÇE, Caner BAL, Atilla ÖZKAN, Dicle DENİZ'e teşekkür ederim. Damla Korkmaz, Hanne ALTIN, Nurşah ÖZTUNÇ ve Rabia KALKAN'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya ŞİŞLİ'ye bana kattığı herşey için teşekkür ederim. Her zaman her konuda en büyük destekçim olan annem Esen BALÇIKANLI'ya, attığım her adımda örnek aldığım babam M.Yavuz BALÇIKANLI'ya ve kardeşim Ahmet BALÇIKANLI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                                  |      |
|--------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI FORMU .....                            | i    |
| BEYAN.....                                       | ii   |
| İTHAF .....                                      | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                   | iv   |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....             | vii  |
| ŞEKİLLERİ LİSTESİ .....                          | viii |
| TABLoların LİSTESİ .....                         | ix   |
| 1. ÖZET.....                                     | 1    |
| 2. ABSTRACT .....                                | 2    |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ .....                           | 3    |
| 4. GENEL BİLGİLER.....                           | 4    |
| 4.1. İskemik Beyin Felcinin Patofizyolojisi..... | 5    |
| 4.1.1. Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite ..... | 5    |
| 4.1.2. Oksidatif stres.....                      | 6    |
| 4.1.3. Ödem .....                                | 7    |
| 4.1.4. Peri-enfarkt depolarizasyon. ....         | 7    |
| 4.1.5. Apoptoz-nekroz.....                       | 8    |
| 4.1.6. Enflamasyon.....                          | 8    |
| 4.2. Klinik Tedaviler .....                      | 9    |
| 4.2.1. T-PA.....                                 | 9    |
| 4.2.2. Hiperbarik oksijen tedavisi .....         | 10   |
| 4.2.3. Hipotermi .....                           | 10   |
| 4.2.4. rTMS tedavisi.....                        | 10   |
| 4.3. Tedavide Karşılaşılan Zorluklar.....        | 11   |
| 5.MATERYAL VE METOT .....                        | 13   |
| 5.1. Deney Düzeni ve Deney Setleri .....         | 13   |
| 5.2. Deney Dizaynı.....                          | 13   |
| 5.3. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli .....  | 14   |
| rTMS Uygulaması.....                             | 15   |
| 5.4. Laser Speckle Görüntüleme .....             | 16   |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.5. Beyin Kesitleri Alma.....                               | 17        |
| 5.6. Creysl Violet Boyaması .....                            | 17        |
| 5.7. QPCR Analizi Gen Değişikliklerinin Tespiti.....         | 18        |
| 5.8. RNA İzolasyonu.....                                     | 19        |
| 5.8.1. cDNA sentezi .....                                    | 19        |
| 5.8.2. cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları.....     | 20        |
| 5.9. Gerçek Zamanlı PCR (QPCR) ve Kullanılan Primerler ..... | 21        |
| 5.9.1. qPCR analizi.....                                     | 23        |
| 5.11. İstatistik.....                                        | 23        |
| <b>6. BULGULAR.....</b>                                      | <b>24</b> |
| 6.1. Laser Doppler.....                                      | 24        |
| 6.2. Laser Speckle Görüntüleme .....                         | 25        |
| 6.3. Hasar Hacmi.....                                        | 28        |
| 6.4. İskemi Sonrası Gen Seviyesindeki Değişiklikler.....     | 29        |
| <b>7. TARTIŞMA .....</b>                                     | <b>37</b> |
| <b>8. SONUÇ.....</b>                                         | <b>41</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR .....</b>                                    | <b>42</b> |
| <b>10. ETİK KURUL ONAYI .....</b>                            | <b>50</b> |
| <b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                     | <b>51</b> |

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

|       |                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| AMPA  | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid |
| ATP   | Adenozin trifosfat                                           |
| BDNF  | Beyin kökenli nörotrofik faktör                              |
| CDNF  | Serebral dopamin nörotrofik faktör                           |
| CNTF  | Siliyar nörotrofik faktör                                    |
| DNA   | Deoksiribo nükleik asit                                      |
| HBO   | Hiperbarik oksijen                                           |
| HDM   | Hücre dışı matriks                                           |
| IL    | İnterlökin                                                   |
| KBB   | Kan beyin bariyeri                                           |
| LDF   | Laser Doppler flowmetri                                      |
| MANF  | Mezensefalik astrosit kaynaklı nörotrofik faktör             |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat                        |
| NMDA  | N-metil-D-aspartat                                           |
| OSAT  | Orta serebral arter tıkanması                                |
| PBS   | Fosfat tamponlu salin                                        |
| ROS   | Serbest oksijen radikalleri                                  |
| TGF   | Transforming growth factor                                   |
| TNF   | Tümör nekroz faktörü                                         |
| T-PA  | Doku plazminojen aktivatörü                                  |
| VEGF  | Vasküler endotelyal büyüme faktörü                           |



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.2.1. Deney seti, IF çalışmaları, Gen çalışmaları, Laser Speckle çalışmaları                                                                                                              | 14 |
| Şekil 6.1.1. Laser Doppler beyin kan akımı grafiği. ....                                                                                                                                         | 24 |
| Şekil 6.2.1. 90 dakika OSAT modeli sonrası Laser Speckle görüntüsü.....                                                                                                                          | 25 |
| Şekil 6.2.2. 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen iskemik kor bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi .....     | 25 |
| Şekil 6.2.3. 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen iskemik penumbra bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi..... | 26 |
| Şekil 6.2.4. 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen iskemik penumbra bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi..... | 27 |
| Şekil 6.3.1. 90 dakika deneysel iskemi modeli sonrasında hasar hacminin Cresyl violet boyaması ile değerlendirilmesi .....                                                                       | 28 |
| Şekil 6.4.1. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin İnterlökin-1 $\beta$ ve TNF- $\alpha$ ekspresyonuna etkisi .....                                                                                     | 29 |
| Şekil 6.4.2. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin TGF $\beta$ ve MMP-9 ekspresyonuna etkisi .....                                                                                                      | 30 |
| Şekil 6.4.3. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin VEGF-A ve VEGF-B ekspresyonuna etkisi.....                                                                                                           | 31 |
| Şekil 6.4.4. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin GAP43 ve Ncam1 ekspresyonuna etkisi .....                                                                                                            | 32 |
| Şekil 6.4.5. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin CTNF ve CDNF ekspresyonuna etkisi. ....                                                                                                              | 33 |
| Şekil 6.4.6. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin BDNF ve MANF ekspresyonuna etkisi. ....                                                                                                              | 34 |
| Şekil 6.4.7. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin Nörocan ve Versican ekspresyonuna etkisi .....                                                                                                       | 35 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 6.4.8. 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin Efrin A5 ve Netrin-1 ekspresyonuna etkisi ..... | 36 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## TABLULARIN LİSTESİ

|                                                                                                                                 | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 5.8.1.Elde edilen dokulardan cDNA sentezi, RNA izolasyonu ve qPCR gen seviyesindeki değişiklikler 16 gende incelendi..... | 18       |
| Şekil 5.10.1. Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri .....                                                     | 21       |



## 1. ÖZET

### REPETATİF TRANSKRANİYAL MANYETİK STİMÜLASYONUN (rTMS) BEYİN FELCİ SONRASI HASARA ETKİSİ

Repetatif transkraniyal manyetik stimülasyon (rTMS) tedavisi invazif olmayan, frekansı uyarıcı veya inhibe edici olmak üzere ayarlanabilen, beyin felci sonrası hemisferler arası düzeni tekrar sağlayan tedavi yöntemidir. Her ne kadar rTMS tedavisi klinikte sıklıkla kullanılsa da rTMS uygulamasının etki ettiği moleküler mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Beyin felci gelişmekte olan ülkelerde 2. ölüm sebebidir. rTMS tedavisinin, beyin felci sonrası moleküler mekanizmalardaki etkilerini araştırmak için 90 dakika orta serebral arter tıkanması modeli BALB/c farelerde oluşturuldu. Reperfüzyon başlangıcında uygulanan rTMS tedavisinin serebral kanlanma, hasar hacmi, ve gen ekspresyon değişiklikleri üzerindeki etkileri incelendi. Deney gruplarına 1 Hz inhibe edici, 20 Hz uyarıcı etki gösteren rTMS tedavisi uygulandı. Kontrol grubu rTMS tedavisi almadı. 20 Hz rTMS tedavisi kontrol grubuna ve 1 Hz grubuna göre iskemik kor bölgesinde, penumbra alanında ve hasarsız kortekste serebral kanlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdı ve hasar hacmini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. 20 Hz rTMS tedavisinin gen ekspresyonunda yaptığı değişiklikler enflamasyonun azaltılmasına, nöroplastisiteye ve vasküler regülasyona katkı sağladığı görüldü. Uygulanan 20 Hz rTMS tedavisinin beyin felci sonrası sonrası gen ekspresyonunu regüle ederek ve serebral kanlanmayı arttırarak hasarı azalttığı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** rTMS, Serebral İskemi, Tedavi

## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF REPETITIVE TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION (rTMS) ON POST- BRAIN STROKE DAMAGE**

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a non-invasive treatment method whose frequency is regulated as stimulator or inhibitor, which provides the balance between hemispheres after brain stroke. Although rTMS treatment is often used in clinic, effect of TMS on the molecular mechanism is unknown. Brain stroke is the second cause of death in the developing countries. A 90-minute of middle cerebral artery occlusion was induced in BALB/c mice to investigate the effects of rTMS treatment on molecular mechanism post-stroke. The rTMS treatment was administered at the beginning of reperfusion and the effects of treatment on infarct volume, cerebral blood flow and gene expression changes were examined. Experimental groups were designed as 1 Hz rTMS (inhibitory) application group, 20 Hz rTMS (stimulatory) application group whereas the rTMS treatment was not applied to the control group. 20 Hz rTMS treatment increased the cerebral blood flow in the ischemic core area, penumbra area and undamaged cortex when compared with control group. Also, 20 Hz rTMS treatment reduced the infarct volume. 20 Hz rTMS treatment regulated gene expression that contributes the reduction of inflammation, induction of the neuroplasticity related genes and the vascular regulation. It is believed that by regulating gene expression and increased cerebral blood flow the application of 20 Hz treatment decreased infarct volume.

**Key Words:** rTMS, Cerebral Ischemia, Treatment

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütü verileri incelendiği zaman ölüm nedenleri arasında 2. sırada görülen beyin felci, görülme sıklığı gittikçe artan ve ciddi sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olan bir rahatsızlıktır (1). 2013 yılı verilerine göre 25.7 milyon kişi inme vakasına sahiptir (2). Gelişmekte olan ülkelerde inme vakasıyla karşılaşma oranı sağlıklı yaşam tarzının benimsenmesi ile hızlı bir artış göstermektedir. (3,4) Bu artış tekrarlama sıklığını ve inmeye bağlı gelişen sağlık problemlerini de beraberinde getirmektedir (2,5). Yapılan araştırmalar sonucunda Amerika'da inmeye maruz kalmış birey sayısı yılda yaklaşık 800.000 kişiyi bulmaktadır (6). İnme geçiren bireylerin yaklaşık % 80'i inme sonrası fonksiyonelliklerini kaybetmektedir (7). Yaşla birlikte artış gösteren inmenin giderek artması, ülkelere sağlıklı toplumlar kazandırmakta ve kişilerin ekonomik yük oluşturmalarına neden olmaktadır (8). Amerika'da inmenin ekonomik yükü giderek artmaktadır, inme maliyeti yaklaşık olarak Amerika'da 65.5 milyar dolar gösterilmektedir (9). Yaşlı nüfusta sık görülmesine rağmen inme vakası her yaş grubu için tehdit oluşturmaktadır (10, 11). İnme sonrası akut tedavi uygulamalarında süre kısıtlamasıyla karşılaşmaktadır ve tedavi kapsamı tüm hastaları içermemektedir (3, 12, 13). Akut inme tedavisinin yapılan araştırmaların sonuçlarına dayalı olarak doku plazminojen aktivatörü (t-PA) tedavisi ile sınırlı olduğu gösterilmiştir. 2017 verilerine göre t-PA tedavisinin, 4.5 saat içinde akut müdahale için uygun olduğu gösterilmiştir. Tedavi kapsamı % 10'luk hasta popülasyonunu kapsamaktadır (14, 15). Bu durum mortalite oranının artmasına neden olmaktadır (16). Tedavi yaklaşımında t-PA ile birlikte uygulanacak tedavileri kullanmak tedavinin etkinliği bakımından fayda sağlayabilir (17, 18). Alternatif tedavi seçeneklerinin artırılması, inme sonrası daha fazla hasta popülasyonuna tedavi uygulanmasını sağlayabilir. Bu tezde akut inme tedavisi için seçilen rTMS tedavisinin iskemi sonrası moleküler mekanizmalara, hasar hacmine, serebral kan akımına ve gen ekspresyonundaki değişikliklere olan etkisini incelemek amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, beyin felci vakalarının % 87'sini oluşturan iskemik beyin felci modeli olarak 90 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAT) modeli oluşturuldu.

#### 4. GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre inme 24 saat veya daha uzun süre devam eden, ani bir şekilde gerçekleşen ve ölüme yol açabilen bir rahatsızlıktır (1). Beyin felci beyni besleyen serebral kan akımının kesilmesi sonucu, beyinde nörolojik hasarın meydana gelmesi ile oluşmaktadır (2). İnme, iskemik ya da hemorajik olarak meydana gelebilir. İskemik inme beyni besleyen damarların tıkanması sonucu, hemorajik inme ise damarlardaki yırtılmalar sonucu görülebilir (3). İnmelerin % 87'si iskemi kaynaklı % 10'u hemoraji kaynaklıdır (4). İskemi sonrası hasar merkezden çevreye doğru yayılır. Merkezde geri dönüşümsüz hasar oluşurken, penumbra alanı daha kararsız bir yapıdadır, penumbra alanında hücrel fonksiyonellik devam etmektedir (5). Penumbra'daki serebral kan akımı değişiklikleri, hasarın boyutu hakkında belirleyici rol üstlenir (6, 8). İskemik hasar sırasında temel problem, serebral kan akımı yetersizliğinden kaynaklandığından ilk adım kanlanma problemini ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır. Trombolitik ajan olarak t-PA kullanımı tercih edilmesine rağmen t-PA tedavisinde süre kısıtlamasıyla karşılaşılmaktadır ve t-PA tedavisi tüm hastaları kapsamamaktadır (9, 11). 2017 verilerine göre t-PA tedavisi 4.5 saat içinde müdahale için uygundur ayrıca bu müdahale sadece % 10'luk hasta popülasyonunu kapsamaktadır (12, 13).

#### **4.1. İskemik Beyin Felcinin Patofizyolojisi**

Beyinde görülebilecek enerji eksikliği, beynin işlevselliği bakımından geri dönüşümsüz sonuçların oluşmasına neden olmaktadır (14). İskemik beyin felci sonrası tıkanan damarın etkisiyle serebral kan akımı azalmakta, bunun sonucunda oksijen ve glikoz yetersizliği görülmektedir (15, 16). Enerji yetersizliğine bağlı olarak, beynin elektriksel devreleri bozulmakta ve hücrel membran potansiyeli iyonik dengesini kaybetmektedir (17). Hücrenin homeostazisinin bozulmasına bağlı olarak hücreler depolarize olmaktadır (18). Uyarıcı nörotransmitter olan glutamat hücre dışı ortama salınmaktadır. Ortamda glutamatın miktarının artması kalsiyum, sodyum, ve potasyum iyonlarının membran geçirgenliklerini artırmaktadır (19, 20). Glutamat reseptörlerinden N-metil-D-aspartat (NMDA), reseptörü kalsiyum ve sodyum artışında etkilidir (21). Sodyumun hücre içinde artışı sonucunda hücrede ödem görülür (22). Ödem artışıyla astrositler fonksiyonelliklerini kaybederler (23). Açılan kalsiyum kanallarını kullanıp hücre içinde birikmeye başlayan kalsiyum, toksisiteyi artırmaktadır (24, 25). Kalsiyum protein yapısını bozan, yıkıcı enzimatik aktivitelerin artmasını sağlamaktadır (26). Artan toksik etkilerden sonra, hücrel yıkımı hızlandıran serbest radikallerin artışı, mitokondri fonksiyonelliğinin bozulmasına neden olmaktadır (27). Serbest oksijen radikalleri (SOR) artışı ile birlikte hücrel tahribat artmakta, Deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı ve lipid peroksidasyonu görülmektedir (28). Mitokondrideki fonksiyonel bozulmalar, sonucu ATP üretilmemekte ve apoptoz tetiklenmektedir. Ayrıca hücre membranı yapısındaki lipidlerin ve proteinlerin yapısında hasar meydana gelmektedir (29, 30). Artan toksik etkiler mikrogliya aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır (31).

##### **4.1.1. Enerji eksikliği ve ekzitotoksisite**

Beyin en çok oksijene ihtiyacı olan organlardan biridir, (14) ve tüm enerjinin yaklaşık % 20'sini harcar. Beyin kullandığı ATP'nin yaklaşık olarak % 40 ve % 50'sini iyonik dengenin sürdürülmesi için kullanmaktadır. Beynin ihtiyacı olan oksijen ve glikoz yeterli miktarda sağlanamazsa, hücre membranındaki iyonik dengeyi sağlamak için harcadığı ATP, yetersiz kalır ve iyonik denge kaybedilir (32).

Yetersiz enerji üretimine karşılık, fosfolipid metabolizması için yeterince ATP sağlanamaz. İskemi kaynaklı nöronal hasarın başlangıcı olarak, enerji metabolizmasının yetersizliği kabul edilebilir. ATP metabolizması iyonik dengeyi sağlamaktadır, hücre içi ve hücre dışı iyonik yük dengesini düzenlemektedir.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz pompası, membran potansiyelini dengede tutmaktadır (33). Enerji eksikliğine bağlı olarak  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz pompası çalışmamaktadır. Hücre iyon dengesini kaybeder ve membran potansiyeli bozulur. İyon dengesinin kaybedilmesiyle, hücrel depolarizasyondan sonra glutamat artışı gözlenmektedir (34). Glutamat artışı NMDA ve AMPA reseptörlerinin de uyarılmasını tetiklemektedir (35). Glutamat reseptörlerinden NMDA, kalsiyum ve sodyum geçişine duyarlıdır (21). NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ile toksisite ve hasar boyutu artmaktadır (36). AMPA reseptörü patolojik bir durum yokken, sodyum ve potasyum geçişine duyarlıdır, inme sonrası kalsiyum geçişine duyarlı hale gelmektedir (37). Açılan kalsiyum kanallarını kullanıp hücre içinde birikmeye başlayan kalsiyum, toksisiteyi artırmakta ve protein yapısını bozan, yıkıcı enzimatik aktivitelerin artmasını sağlamaktadır (26). İskemi sonrası, iyon dengesinde düzenleyici rol oynayan astrositler, artan glutamatları tutamamakta ve artan glutamat toksik etkiye neden olmaktadır (38).

#### **4.1.2. Oksidatif stres**

Nörodejeneratif hastalıklarda ve sağlıklı yaşam koşullarında tetiklenen oksidatif stres hasarın kötü prognoza sahip olmasında etkili rol oynamaktadır (39). Hücrede oluşan iyon dengesizlikleri sonrası artan ödem ve oksidatif stres, toksisite artışına neden olmaktadır (40). Patolojik bir durumun varlığında artan SOR miktarına bağlı olarak antioksidanlar yetersiz kalmaktadır (41). SOR artışı ile birlikte hücrel tahribat artmakta, DNA hasarı meydana gelmekte ve lipid peroksidasyonu görülmektedir (28). Hasara bağlı olarak kararsız yapıda bulunan SOR kararlı hale gelmektedir. SOR artışı ile oksidatif stres meydana gelmektedir (42). Oksidatif stres hücrel tahribatta önemli bir role sahiptir, kan beyin bariyerinin (KBB) koruyucu yapısının ortadan kalkmasıyla birlikte hasarı tetikleyici olaylar başlamaktadır. (42).



#### 4.1.3. Ödem

Beyinde meydana gelen sıvı hacmindeki artış, intrakraniyal basıncın değişmesine neden olmaktadır, sonrasında nörolojik hasarı tetiklemektedir (43). Arterlerin tıkanması sonucu kafa içi basıncın artmasının yanısıra diğer bir patolojik bulgu da ödem artmasıdır (44). İskemi sonrası serebral ödem artışının devam etmesi, iskemi vakalarının % 80'inin ölümle sonuçlanmasına neden olmaktadır (45, 46). Hücrenin hayatta kalabilmesi için iyon giriş-çıkışında dengeye ihtiyacı vardır. Hücrede oluşan iyon dengesizlikleri sonrası artan ödem ve oksidatif stres, toksisite artışına neden olmaktadır (47). Kan beyin bariyerlerinin yapısal bütünlüğünün bozulması, glial hücrelerdeki iyon kanallarının hasardan etkilenmesine neden olmaktadır buna bağlı olarak sitotoksik, iyonik ve vazojenik ödem meydana gelmektedir (48). Sitotoksik ödem, hücre hacmindeki değişikliklere bağlı olarak görülmekte ve iyon dağılımındaki dengesizliklere bağlı olarak oluşmaktadır (22, 49).

#### 4.1.4. Peri-enfarkt depolarizasyon

Nöronal hasar, iskemi sonrası artan enerji ihtiyacının karşılanamamasına ve hücre membranındaki iyonik dengenin kaybına bağlı olarak görülmektedir. İskemi süreci başladıktan bir-iki dakika sonra, nöronal hasar tetiklenmektedir (7). Enfarktüs, iskeminin kor bölgesinden penumbraya doğru artış göstermektedir. Nöronal hasar evresi yaklaşık birkaç hafta devam edebilir. Devam eden hasar sürecinde, vazojenik ödem artışı ile birlikte, enflamasyon ve apoptoz da artmaktadır. (7). Peri-enfarktüs genişlemesini sağlayan faktörlerden biri artan hücrel depolarizasyondur (50). Hasarın yayılmasına bağlı olarak, artan enerji ihtiyacı karşılanamamaktadır, hücrel depolarizasyon ve laktat artışı görülmektedir (51). Artan peri-enfarktüs depolarizasyonuna bağlı olarak hasar hacmi artmaktadır (52).

#### 4.1.5. Apoptoz ve nekroz

Apoptoz nöronal hasarın yayılması ile birlikte penumbra alanında artış göstermektedir. Apoptoz hücrel fonksiyonların ne zaman durdurulacağını, planlı bir şekilde gerçekleştirilmesidir (51). Elde edilen verilere göre Bcl-2 ailesi, hücrenin apoptotik aktivitelerini engellemelerine rağmen pro-apoptotik üyeleri (BAX, BAK, BID) apoptozu tetiklemektedir (52, 53). Bcl-2, Bax ve Kaspaz 3 proteinleri hasar sonrası nöronal dejenerasyonda rolü olan proteinlerdir. Hasarın meydana gelmesiyle apoptoz sürecinde etkili olan Bcl-2 ailesine ait proteinler ve p53 geni aktif olmaktadır. Mitokondri apoptozun gerçekleşmesinde önemlidir, mitokondride bulunan sitokrom c'lerin salınmasıyla aktifleşen prokaspazlar apoptozu tetiklemektedir. Bcl-2 proteinleri mitokondri ile ilişki içinde olarak apoptozise yanıt oluşturmaktadır (54). p53 geni işlevsel olarak DNA hasarında görev almaktadır. Hasar tamir edilemezse apoptotik süreçlerin başlatılmasında rol oynamaktadır (55). Mitokondri, pro-apoptotik faktör salınımını ve SOR üretimini tetiklemektedir (56). Mitokondri pro-apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır. Bu proteinler apoptozu tetikleyecek kaspaz yollarını aktifleştirmektedir (57). Apoptozu tetikleyen kaspaz kaskadı hücre içinden ve hücre dışından gelen sinaptik uyarılarla tetiklenmektedir (58). Kaspaz aktivasyonunun artması nöronal hasarın artmasına neden olmaktadır (59). Serebral kanlanma yetersizliğine bağlı olarak, nekrotik süreç tetiklenmekte ve hasarın yayılması hız kazanmaktadır (6). Nekrotik aktivasyonun yayılma sürecinde SOR artışının ve JNK yolağının etkili olduğu düşünülmektedir (60). İskemi süreci artışıyla birlikte, mevcut hücrel tahribat ve nekrotik doku miktarı artmaktadır (61).

#### 4.1.6. Enflamasyon

Hasar sonrası enflamatuar cevap her ne kadar nekroza neden olsa da nöronal onarımda enflamasyon nöronal korumanın bir parçasıdır (8). Nöronal onarımda beyni hasara karşı korumak ve işlevselliğini yeniden kazandırmak amaçlanmaktadır (62).

Enflamatuar yanıt, mikrogliaların, lökositlerin ve makrofajların aktivasyonu ile oluşmaktadır (63). Mikroglialar ve makrofajlar nekrotik dokuların yok edilme süreci ile onarım aşamasında rol oynamaktadır (64). İnme sonrası lökositler (64) tarafından salgılanan sitokinler, fagositoz aktivasyonuna sahiptirler. Enflamatuar

yanıtta önemli olan sitokinler: IL-1 (4), TNF-  $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ , Kimokinler ve Prostaglandinlerdir (5). Oluşan enflamatuvar aktiviteler, endotel yapılarıdaki koruyucu bütünlüğün bozulmasına ve kan beyin bariyeri dejenerasyonuna neden olmaktadır (38). Bu bozulmalar nekrozu tetiklemektedir. İskemi sonrası mitokondrinin fonksiyonel aktivitesinin bozulmasıyla SOR artışı meydana gelmektedir (65). Hasar sonrası SOR ve nitrik oksit artışı hasarı artırmaktadır (63). Astrositler enflamasyonun yayılmasını engellemek için skar doku meydana getirirler, bu skar doku hasar hacmini sınırlandırmasına rağmen, yeni aksonal uzantıların oluşmasını engellemektedir (66).

## **4.2. Klinik Tedaviler**

### **4.2.1. T-PA**

İnme için akut tedavi seçeneği sınırlıdır, akut tedavi olarak t-PA tercih edilen tek tedavi seçeneğidir. t-PA serebral kan akımının kesilmesine neden olan pıhtıyı ortadan kaldırmaya çalışmaktadır, pıhtının çözülüp tekrar kanlanmanın sağlanması ve hasardan en az etkilenime sahip olmak tedavinin amacını oluşturmaktadır. Fakat t-PA tedavisinde süre kısıtlaması vardır, ayrıca sürenin kısıtlamasının yanısıra kanama problemi de görülmektedir (13). 2017 verilerine göre t-PA tedavisi 4.5 saat içinde akut müdahale için uygundur, fakat bu müdahale sadece % 10'luk hasta popülasyonunu kapsamaktadır (66). t-PA uygulamalarında kanama riski ve toksik etkilerle karşılaşmaktadır, bunun sonucunda t-PA tedavisi nöronal korumada yetersizlik kalmaktadır. t-PA tedavisinde süre kısıtlaması ile her hastada kullanılmaması yönünden araştırmalara ve alternatif tedavilere ihtiyaç vardır (67).

#### **4.2.1. Hiperbarik oksijen tedavisi**

Hiperbarik oksijen, 1 atmosfer basınçtan daha yüksek bir basınçta, bireylerin oksijen tedavisi aldığı yöntemdir (68). Hbo tedavisi akut tedavi olarak uygulanan ve invazif olmayan bir tedavi seçeneğidir (69). Hbo tedavisi yapılan çalışmalara göre kan akımı yetersizliği sonucu karşılaşılan, oksijen eksikliği tedavisinde etkilidir. Hbo tedavisi, hasar oluşumunda önemli bir etken olan oksidatif stresi azaltmaktadır (70). Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği hücresel tahribatı azaltmak için antioksidanlar devreye girmektedir. Yoğun oksijen tedavisi antioksidanların etkinliğini artmaktadır, fakat yüksek dozda alınması halinde hücresel tahribata neden olmaktadır (71).

#### **4.2.2. Hipotermi**

Hipotermi tedavisinin ödem ve kanama gibi patolojik durumlarda etkili olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Hipotermi tedavisi hasarı tetikleyen mekanizmalarda etkilidir, apoptoz üzerinde, sinyal yolları üzerinde ve toksisite üzerinde olumlu etkiye sahiptir (72). Glutamat'ın tetiklediği toksik etkileri engellemektedir. Deneysel hayvan modellerindeki etkinliği güzel sonuçlar göstermesine rağmen klinikteki sonuçlar yetersizdir (73) ve klinikteki etkisi net olarak bilinmemektedir (72).

#### **4.2.3. rTMS tedavisi**

Akut inme tedavisinde kullanılan terapatik ajanlar sınırlıdır. Tedavi yöntemlerinden rTMS tedavisi, hasar hacminde etki gösteren, tekrarlı olarak manyetik uyarımlarla beyni uyaran, invazif olmayan bir tedavi yöntemidir. Oluşan manyetik uyarımlar, kortikal uyarılabilirliği artırmaktadır. Uyarılabilirliğin artması ile birlikte, hasar nedeniyle görülen fonksiyonel kayıplarda azalma görülmektedir. İnme sonrası meydana gelen fonksiyonel kayıpların nedeni, hasarın oluşmadığı hemisferin, hasardan etkilenen hemisferdeki uyarılabilirliği azaltılmasıdır (74).

Manyetik uyarımlar, kortikal alandaki uyarılabilirliği artırarak, aksonal depolarizasyonun artmasını sağlamaktadır (75). rTMS tedavisinin çalışma prensibi, etkilenen hemisferdeki uyarılabilirliğin artırılmasına yöneliktir. rTMS tedavisi yüksek (20 Hz) ve düşük frekanslarda (1 Hz) uyarılabilirliği artırmak ve azaltmak amacıyla uygulanabilir. Uygulanan yüksek frekanslı rTMS tedavisinin uygulama amacı, hasardan etkilenen hemisferdeki uyarılabilirliği artırmak, uygulanan düşük frekanslı rTMS tedavisinin amacı ise, hasar hacmindeki uyarılabilirliği baskılayan etkileri ortadan kaldırmaktır (74). Yapılan çalışmalar sonucunda manyetik uyarımların, nöronal fonksiyonelliğe ve nöronal iyileşmeye katkı sağladığı görülmektedir (76, 77). Yapılan araştırmalar neticesinde yüksek frekanslı rTMS uygulamalarının kortikal uyarılabilirliği artırdığı, düşük frekanslı rTMS uygulamalarının ise korteks üzerinde uyarılabilirliği baskıladığı görülmektedir (78). rTMS tedavisi için, manyetik uyarımın etki edeceği rTMS cihazının bobini kafatası bobin üzerine gelecek şekilde yerleştirilir (79) rTMS tedavisinin hedeflerinden biri hemisferler arası düzeni tekrar sağlamaktır (80). Yapılan çalışmalara göre hasarlı bölgeye uygulanan yüksek frekanslı rTMS uygulamaları, hasar çevresini de etkileyerek nöronal iyileşmeye katkı sağladı. Düşük frekanslı rTMS uygulamaları ise hasardan sonra hemisferler arası denge üzerinde etki gösterebilir (81). rTMS uygulamaları sonrası gen ekspresyonları değişebilir (82). rTMS tedavisi nöronal plastisiteyi de desteklemektedir. (83, 84). Hasar hacminin artışına bağlı olarak hasarsız hemisferdeki uyarıların artışı, fonksiyonel kaybı artırmaktadır (85, 86). Araştırmalar sonucunda, rTMS tedavisi uygulanan hasta popülasyonu fazladır (87) .

#### **4.3. Tedavide Karşılaşılan Zorluklar**

Oluşturulan deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmasına rağmen, insanlar ve hayvanlar arasındaki beynin morfolojik yapı değişikliği ve yaş gibi farklılıklar bu çalışmaların klinikte yetersiz olmasına neden olmaktadır (88). İskemi geçiren hastalar genellikle yaşlı popülasyonuna sahip olmasına rağmen, deney hayvanları genellikle genç hayvanlardan oluşmaktadır. Diğer bir neden de oluşturulan deneysel reperfüzyon modeli ile klinikte gerçekleşen

reperfüzyon vakasının zaman olarak farklılık göstermesidir (89). HBO tedavisi uygulanan hastalarda yüksek basıncın etkisinden dolayı bazı sağlık problemleri ile karşılaşılabilir; kulakta ve gözde yüksek basınç etkisine bağlı sorunlar, kulakta basınç farkı etkisine bağlı barotravma, gözde görme kusurları oluşabilir. rTMS tedavisinin, iskemi sonrası kanlanma, hasar hacmi ve gen seviyelerinde olumlu etkileri olmasına rağmen rTMS tedavisinin etkilediği moleküler mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir (90).



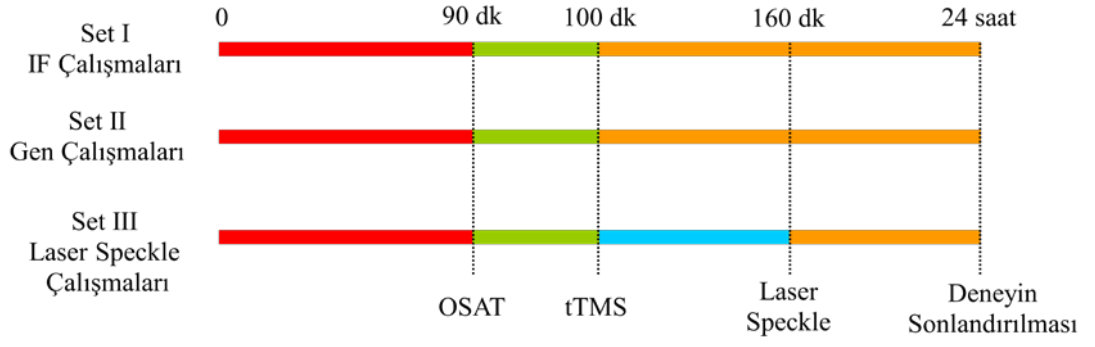
## **5. MATERYAL VE METOT**

### **5.1. Deney Düzeni ve Deney Setleri**

Yapılan deneysel çalışmalar için İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı. Yapılan çalışmalarda kullanılan hayvanların biyolojik ritim periyotları 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlendi. Bu çalışmada 8-12 haftalık erkek BALB/c farelere 90 dakika orta serebral arter tıkanması (OSAT) metodu uygulandı. Sonrasında fareler rastgele 3 gruba ayrıldı; 1 Hz veya 20 Hz rTMS tedavisi uygulanan gruplar ve kontrol grubu (rTMS uyarımı yok) olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Deneyde kontrol, 1 Hz ve 20 Hz olarak düzenlenen gruplardaki hayvan sayıları n=8 olacak şekilde belirlendi.

### **5.2. Deney Dizaynı**

rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar hacmine etkisi ve gen düzeyindeki çalışmalar için iki farklı deney seti oluşturuldu. rTMS tedavisinin beyin felci sonrası iskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks bölgelerindeki serebral kan akımına olan etkileri için ise ayrı bir set olmak üzere toplam 3 farklı deney seti düzenlendi. Set I ve set II için farelere uygulanan 90 dakika OSAT modeli'nin ardından 1 dakika boyunca Laser Doppler cihazı ile kan akımı kaydı alındı. Ardından farelere 10 dakika süresince 1 Hz, veya 20 Hz rTMS tedavisi uygulandı. Kontrol grubuna 10 dakika boyunca sadece % 1'lik izofloran anestezi uygulandı. rTMS tedavilerinden sonra kendi kafeslerine geri alınan fareler 24 saatlik reperfüzyonun ardından yüksek doz anestezik kullanılarak kurban edildi. Set III için ise 90 dakika OSAT sonrasında farelerin beyin kan akımları 1 dakika süresince izlendikten sonra farelere 1 Hz veya, 20 Hz rTMS tedavisi uygulandı. Sonrasında farelerin beyin kan akımı 60 dakika süresince Laser Speckle görüntüleme cihazı (PeriFlux Sistem 5000, Perimed, İsveç) kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlendi. Fareler tekrardan kendi kafeslerine alınarak reperfüzyonun 24. saatinde fareler yüksek doz anestezik kullanılarak kurban edildi.



**Şekil 5.1.1.** Deney seti, IF çalışmaları, Gen çalışmaları, Laser Speckle çalışmaları

Deney dizaynı. OSAT : orta serebral arter tıkanması, TMS: transmanyetik uyarıcı, IF: immünfloresan.

### 5.3. Orta Serebral Arter Tıkanması Modeli

Çalışma grubundaki BALB/c fareler ilk olarak % 1'lik izofloran (N0015A09, Adeka, Türkiye, % 30 oksijen, kalanı N<sub>2</sub>O) ile gaz anestezisine alındı. Fareler ısıtıcı pet (507221F, Harvard Apparatus, ABD) üzerine OSAT sırasında sırtüstü olacak şekilde yerleştirildi. Deney protokolü süresince geri-bildirim tekniğiyle çalışan rektal ısı ölçer sıcaklık değerlerine göre artan veya azalan ısıtıcı pet yardımıyla, hayvanlarının vücut sıcaklık değerlerinin 36.5, 37 ° derecede kalması sağlandı. Beyin felci boyunca beyin kan akımı Laser Doppler kan akımı (LDF) cihazı kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlendi. Bunun için kafatası derisi, deri makası yardımıyla probu (Perimed, Stockholm, İsveç) yerleştirmek için kesilerek açıldı. Cihazın probu bregma noktası merkez kabul edilerek bregmadan 2 mm posteriora ve 6 mm laterale gelecek şekilde yapıştırıcı yardımıyla kafatası üzerine dik bir şekilde yapıştırıldı. Monofilament tekniği kullanılarak 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT gerçekleştirildi. İlk olarak kommon karotise ulaşmak ve izolasyonunu yapmak amacıyla boyun bölgesinin orta hattına kesi atıldı. Kesi yerinden girip, kommon karotis arterlerin izolasyonu sağlandıktan sonra, kommon karotis arterin altından 6.0 ipek ip (S2185, Doğan, Türkiye) ile bağlandı. Eksternal karotis arter de aynı yöntemle bağlanıp artere gelen kan akışı kesintiye uğratıldı.



Sonraki aşama olarak internal karotis artere kısa bir süreliğine klips (FD562R, Aesculap, Almanya) takılarak artere gelen kan akışı engellendi. İskemi modeli oluşturmak amacıyla internal karotis arterin tıkanması için kalınlığı 7.0 (P0812, Doğsan, Türkiye) olan silikon monofilament ip tercih edildi. Kommon karotise ince damar makasının ucu ile küçük bir kesi atıldı. Kesi atılan yerden girdikten sonra arteri geçici olarak tıkayan klipse doğru monofilament 7.0 ip itilmeye devam edildi. 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT modelinin oluşturulması için yaklaşık olarak 9 mm orta serbral artere doğru monofilament ip ilerletildi. Oluşturulan 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT doğruluğunu teyit etmek için, LDF cihazı kullanılarak beyin kan akışındaki düşüş elde edilen anlık serebral kan akımı verilerine göre analiz edildi. 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT oluşturulduktan sonra boğazın kurumamasına dikkat edildi, boğaz ıslak peçete yardımıyla nemli tutuldu. Solunum kontrolü düzenli aralıklarla yapıldı. Beyin felci başlangıcından 90 dakika sonra monofilament geri çekilerek reperfüzyon aşamasına geçildi. 1 dakika süresince beyin kan akımı takip edildikten sonra kommon karotise kadar atılan boğazdaki kesi yeri 5.0 ip (S2185, Doğsan, Türkiye) ile dikildi. Sonrasında farelere kendi gruplarına göre rTMS tedavisi uygulanarak 24 saat sonunda fareler yüksek doz anestezik kullanılarak sakrifiye edildi.

#### **5.4. rTMS Uygulaması**

90 dakika OSAT modelinden sonra rTMS'nin akut dönemdeki iyileşme olan etkisini incelemek için 1 Hz, 20 Hz veya kontrol grubu rTMS uygulandı. 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT uygulandıktan sonra, reperfüzyon başlangıcında 10 dakika rTMS uygulanmasının hasar hacmine etkisine, serebral kan akımına etkisine ve gen seviyesindeki değişikliklere olan etkisine bakıldı. rTMS tedavisi, kısa süreli ve tekrarlı manyetik uyarımlar verilerek yüksek frekanslı ve düşük frekanslı olmak üzere uygulandı. Deney hayvanlarının kafatası uyarımın gerçekleştiği rTMS cihazının bobini üzerine gelecek şekilde konumlandırıldı. Anestezisi olarak % 1'lik izofloran (N0015A09, Adeka, Türkiye, % 30 O<sub>2</sub>, kalanı N<sub>2</sub>O) gaz anestezisi yöntemi tercih edildi. OSAT modeli sonrası, beyindeki manyetik uyarım sayesinde beyinde lokal bir manyetik alan oluşturuldu. Oluşturulan manyetik alan aracılığı ile

beyin bölgelerinde iskemik hasar hacminde, iskemik penumbra da ve hasarsız kortekste elektriksel uyarımlar gerçekleştirildi. Deney dizaynı 1 Hz ve 20 Hz deney grupları için 5 saniye uyarım, 55 saniye dinlenim olacak şekilde 10 tekrar şeklinde uygulandı. 1 Hz grubu 5 saniye süresi boyunca 5 uyarı alırken, 20 Hz grubu 5 saniye süresince 100 uyarı aldı. Kontrol grubu için ise fareler manyetik uyarıyı aldıkları bobinin üzerine yerleştirilerek rTMS tedavilerinde oluşturan şartların aynısı gerçekleştirildi. Tüm rTMS uygulamaları süresince bobinin sıcaklığı 28-40°C arasında tutuldu.

### **5.5. Laser Speckle Görüntüleme**

Deney hayvanları % 1'lik izofloran ile anesteziye alınarak stereotaksi cihazına (World Precision Instruments, Berlin, Germany) yerleştirildi. Deney süresince geri-bildirim prensibiyle çalışan rektal ısı ölçer kullanılarak farelerin vücut sıcaklığı sıcaklık 36.5, 37°C arasında kalması sağlandı. Kafatasının derisi orta hattan makas yardımıyla kesildi, yüzey steril % 0.9'luk NaCl ile temizlendi. Daha sonra 90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT oluşturuldu. Ardından 1 dakika reperfüzyondan sonra gerçek zamanlı serebral kan akımı değişiklikleri Pericam PSI sistemi (Perimed) kullanılarak beynin yaklaşık 10 cm üzerine bir CCD kamera yerleştirilerek kaydedildi. Laserin penetrasyon derinliği (785 nm), beyin yüzeyinin yaklaşık 500 µm altındadır. Ham speckle görüntüleri 20 µm'lik mekansal görüntü çözünürlüğü ile 2 saniye aralıklarla çekildi. İskemik merkez, iskemik penumbra ve hasarsız korteks serebral kan akımı değişikliklerini 1.0 mm x 5.5 mm (sırasıyla lateral ve rostokaudal yönde) boyutunda kapsadığı alanları değerlendirmek için, bregmaya göre 0.5, 1.5 ve 2.5 mm lateral ve 0.5 mm posterior serebral kan akımı perfüzyonu (PIMSoft Perimed) görüntüleme yazılımı kullanılarak hesaplandı.

## 5.6. Beyin Kesitleri Alma

90 dakika deneysel iskemi modeli OSAT modeli oluşturulduktan sonra, reperfüzyon başlangıcından 24 saat geçmesinin ardından deney hayvanları yüksek doz anestezi (izofloran) altında dekapite edildi. Çıkarılan beyinler -70 derece kurubuz üzerinde donduruldu. Dondurulan beyinler falkon içine alınıp kesit alınana kadar -80 derece dolaba kaldırıldı. Kryostat cihazı (CM1950, Leica, Almanya) yardımıyla manuel olarak kalınlığı 18 µm olan kesitler alındı. Kryostat cihazı'nın içi -20, -24 derece, kesitlerin alındığı metal tabla ise -20, -22 derece olacak şekilde ayarlandı, alınan kesitler pozitif yüklü lamlara (Isoterm, Almanya) alındı. Beyin dokusu kesitleri alınırken bregma odak olarak seçildi, bölgeler arası 2 mm uzaklık olacak şekilde beyin 4 bölgeye ayrıldı. Pozitif lam üzerine her cam için 2 beyin kesiti alınmaya çalışıldı. Elde edilen beyin kesitleri Pozitif lam üzerinde fikse işlemini sağlamak için 40 dereceye ayarlanmış ısıtıcı üzerinde 30 dakika süresi boyunca bekletildi. Sabitlenen beyin kesitleri önceden -20 derecede soğutulan slayt kutularına yerleştirildi ve boyama yapılana kadar -20 derece dolapta muhafaza edildi.

## 5.7. Creysl Violet Boyama

Kryostat cihazı kullanılarak elde edilen kesitlerin fiksasyonu için % 4 paraformaldehit (PFA, 1040051000, Merck, ABD) kullanıldı. Daha sonra kesitler PFA'dan fosfat tamponlu salin ile yıkama yapılarak arındırıldı ardından slaytlar steril su ile yıkandı. Yıkama işlemleri çalkalayıcı cihazın üzerinde yapıldıktan sonra creysl violet boyaması yapıldı. Creysl violet boyasının üzeri alüminyum folyo ile kaplandı, boyanan kesitler alkol serisinden geçirildi ve ksilen (534056, Sigma Aldrich, ABD) ile berraklaştırıldı. Boyanan kesitlerin üzerine entellan (1.079.610.500, Merck Millipore, ABD) damlatılarak ince lamel ile (Isoterm, Almanya) kapatıldı. Boyama işlemi tamamlanan beyin kesitlerinin tarama işlemi tarayıcı yardımıyla gerçekleştirildi. Analiz için Image J programı kullanıldı. Image J programı (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) ile manuel olarak ölçüm yapıldı, sağlam taraf ve hasarlı taraf arasındaki hasar hacmi farkı karşılaştırıldı.

## 5.8. QPCR Analizi Gen Değişikliklerinin Tespiti

90 dakika deneysel fokal serebral iskemi modeli OSAT oluşturulduktan sonra uygulanan rTMS uygulamalarının, gen ekspresyonu üzerindeki etkileri qPCR yöntemi ile incelendi. Deney hayvanları oluşturulan 90 dakika OSAT modelinin ardından, reperfüzyon aşamasından 24 saat sonra qPCR analizlerine başlandı. Beyinlerden elde edilecek kesitler -70 derece kuru buz üzerine yerleştirilen beyinlerden, bregma odak seçilerek rostral 2 mm, kaudal 2 mm bloklar olacak şekilde alındı. Elde edilen bloklar konralateral ve ipsilateral örnek dokular aynı gruba sahip olan dokular birlikte koyuldu. RNA izolasyonu yapılacak zamana kadar örnekler -80 °C de muhafaza edildi. Elde edilen dokulardan cDNA sentezi, RNA izolasyonu ve qPCR gen seviyesindeki değişiklikler 16 gende incelendi (Tablo 5.8.1’de gösterilmiştir).

**Tablo 5.8.1.** Elde edilen dokulardan cDNA sentezi, RNA izolasyonu ve qPCR gen seviyesindeki değişiklikler 16 gende incelendi.

|                                                                |              |               |             |      |      |
|----------------------------------------------------------------|--------------|---------------|-------------|------|------|
| Damar Oluşumu ile İlgili Genler                                | VEGF-B       | VEBF-A        | MMP-9       |      |      |
| Plastisiteyi Tetikleyen, Hücresel Yaşam Üzerinde Etkili Genler | GAP43        | CNTF          | BDNF        | CDNF | MANF |
| Plastisite Üzerinde Etkili Genler                              | Ncam1        | Efrin A5      | Versican    | Ncan | Ntn1 |
| Enflamasyon Üzerinde Etkili Genler                             | IL-1 $\beta$ | TNF- $\alpha$ | TGF $\beta$ |      |      |

## 5.9. RNA İzolasyonu

90 dakika OSAT modelinin ardından, reperfüzyon aşamasından 24 saat sonra elde edilen dokulardan Qiagen AllPrep RNA/DNA/Protein İzolasyon kiti (80004; Qiagen, ABD) kullanımı tercih edilerek, RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Örnekler, kit içindeki uygulama protokolüne uygun bir şekilde, cam homojenizatör yardımıyla 600 µL RLT lizis tamponu içinde ezildi ve örnekleri homojenize etmek amacıyla 21G uçlu şırıngadan geçirildiler. Dokuların üstte kalan fazının alınması için 18.000 g'de 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı ardından kitteki DNA'nın spin kolonuna yüklenmesi yapıldı. % 70'lik etil alkol kolondan akan sıvı fazla eşit hacime sahip olacak şekilde eklendi. Kit içindeki RNeasy spin kolonuna süspansiyonun, yükleme işleminden sonra santrifüj 10.000 g'de 30 sn boyunca yapıldı. RW1 yıkama çözeltisi kit ile birlikte geldi. Kolonun yıkanması 1 kez RW1 yıkama çözeltisi kullanılarak, 2 kez de RPE yıkama çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Yıkanan kolon kuruması amacıyla mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra santrifüj işlemi 1 dakika süresince 18.000 g'de yapıldı. Ardından yeni temiz mikrosantrifüj tüp kolonun altına yerleştirildi, 50 µl RNase bulunmayan su kolona eklenerek santrifüj işlemi 1 dakika süresince 10.000 g'de yapıldı. Protokülün sonunda elde edilen RNA'lar -80 °C'de muhafaza edildi.

### 5.9.1. cDNA sentezi

Ayrıştırılan RNA örneklerinin konsantrasyonu OD260 ölçümü üzerinden Implen P330 NanoPhotometer cihazı yardımıyla hesaplandı. Örneklerin tamamının saflığı (OD260/OD280 ve OD260/OD230) belirlendi. Komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirmek için edilen değerler doğrultusunda, RNA her örnekten 1 µg alınacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kullanılan kit Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04896866001; Roche, ABD).

### 5.9.2. cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları

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

Tercih edilen kit 1 µg RNA'ya karşılık gelen hacimde 0,2 µL'lik PCR tüpleri kullanılarak oligo (dT) primerler random primerlerle karıştırma işlevi gerçekleştirildi ve 10 dakika 65 °C'de inkübe edildi termal döngü cihazı kullanılarak (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, ABD) ardından buz üzerine yerleştirildi. Bu işlemler kit içindeki protokolle uyumlu bir şekilde gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranlarında gösterildiği gibi 24 reaksiyon için temel karışım hazırlandıktan sonra her bir reaksiyon için 10,5 µl olacak biçimde tüplere paylaştırıldı ve tüp başına toplam hacim 30 µl oldu. Reaksiyon 50 °C'de 1 saat süresince gerçekleşen inkübasyonun sonraki adımı olarak, 80 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi, ve termal döngü cihazına yeniden alındı. Reaksiyon sonucu olarak ortaya çıkan cDNA örnekleri 1:10 oranında RNA ve DNA içermeyen su kullanılarak, qPCR çalışması için seyreltildi. Stok çözeltiler -80 °C'de muhafaza edildi.

### 5.10. Gerçek Zamanlı PCR (QPCR) ve Kullanılan Primerler

Gen düzeyindeki değişiklikleri incelemek için kullanılan cihazlar ve karışım: Bio-Rad markalı CFX Connect Real Time System cihazı ve Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (1725270, Bio-Rad, ABD) karışımı kullanıldı.

**Tablo 5.10.1.** Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri

| qPCR Primer Listesi |              |    |                                  |
|---------------------|--------------|----|----------------------------------|
| İsim                | Numara       |    | Sekans                           |
| IL-1 $\beta$        | NM_008361    | F: | 5'- GCAACTGTTCTGAAGTCAACT-3'     |
|                     |              | R: | 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT - 3'    |
| TNF-a               | NM_013693    | F: | 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTC T - 3' |
|                     |              | R: | 5'- GCTACGACGTGGGCTACAG - 3'     |
| TGF $\beta$         | NM_011577    | F: | 5'- CTCCCGTGGCTTCTAGTGC -3'      |
|                     |              | R: | 5'- GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG - 3'  |
| VEGF-B              | NM_011697    | F: | 5'-GCCAGACAGGGTTGCCATAC-3'       |
|                     |              | R: | 5'- GGAGTGGGATGGATGATGTCA G -3'  |
| VEGF-A              | NM_001025250 | F: | 5'-ACCATGAACTTTCTGCTCTCTT G - 3' |
|                     |              | R: | 5'-GAACTTGATCACTTCATGGGAC T -3'  |
| MMP-9               | NM_013599    | F: | 5'- CTGGACAGCCAGACACTAAAG-3'     |

|          |              |    |                                     |
|----------|--------------|----|-------------------------------------|
|          |              | R: | 5'- CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG-3'         |
| GAP43    | NM_008083    | F: | 5'TGGTGTCAAGCCGGAAGATAA -3'         |
|          |              | R: | 5'- GCTGGTGCATCACCCCTTCT -3'        |
| Ntn1     | NM_008744    | F: | 5'- TGTGTCAGCGGACTTCCTTC-3          |
|          |              | R: | 5'- AGGAACACTGGCCCAAACAA - 3'       |
| CNTF     | NM_170786    | F: | 5'- TCTGTAGCCGCTCTATCTGG-3'         |
|          |              | R: | 5'- GGTACACCATCCACTGAGTCAA<br>3'    |
| BDNF     | NM_007540    | F: | 5'- TCATACTTCGGTTGCATGAAGG -<br>3'  |
|          |              | R: | 5'- AGACCTCTCGAACCTGCCC -3'         |
| CDNF     | NM_177647    | F: | 5'-CTTTTGCGCCGGGTTTTGTAT-3'         |
|          |              | R: | 5'-AGGGAGTTGTAGAATCGGTCT AA<br>-3'  |
| MANF     | NM_029103    | F: | 5'-TCTGGGACGATTTTACCAGGA - 3'       |
|          |              | R: | 5'- TCTTGCTTCACGGCAAACTTTA<br>-3'   |
| Ncam1    | NM_001113204 | F: | 5'- ACCACCGTCACCACTAACTCT -<br>3'   |
|          |              | R: | 5'-TGGGGCAATACTGGAGGTCA- 3'         |
| Efrin A5 | NM_207654    | F: | 5'- ACACCGTACATGAGTCAGCC -3'        |
|          |              | R: | 5'-ACGGGAGGAGACTGTGCTAT- 3'         |
| Versican | NM_001081249 | F: | 5'- TTTTACCCGAGTTACCAGACTC A<br>-3' |



|      |           |    |                                    |
|------|-----------|----|------------------------------------|
|      |           | R: | 5'-GGAGTAGTTGTTACATCCGTTG C<br>-3' |
| Ncan | NM_007789 | F: | 5'- TGCAACCACGGCTAAGCTC - 3'       |
|      |           | R: | 5'- GGGGATAAGCAGGCAATGAC - 3'      |
|      |           |    |                                    |

Bir cDNA örneği ve gen için kullanılacak ana karışım, cDNA olmadan hazırlandı. Ardından 9'ar ü l olacak şekilde ayarlanarak 96'lık gerçek zamanlı PCR plakasına (Hard Shell PCR Plate, HSP9601, Bio-Rad, ABD) dağıtıldı. Tabloda belirtilen oran baz alındı. Ardından kuyucuklara cDNA örnekleri yüklendi. Termal profilde (98°C'de 30 sn, [95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn] x 40 döngü sonrasında PCR reaksiyonu melt analiz için 55 °C'den 95 °C'ye 0,5 sn) olacak şekilde uygulandı.

#### 5.10.1. qPCR analizi

Gerçek zamanlı PCR analizi yapabilmek için Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazının CFX Manager programı tercih edildi. Cihazdan Ct (Cycle threshold) değerleri elde edilerek kontrol (sadece izofloran alan grup), 1 Hz ve 20 Hz grupları için 16 genin verileri düzenlendi (ipsi ve kontralateral bölgeler için ayrı olacak şekilde).

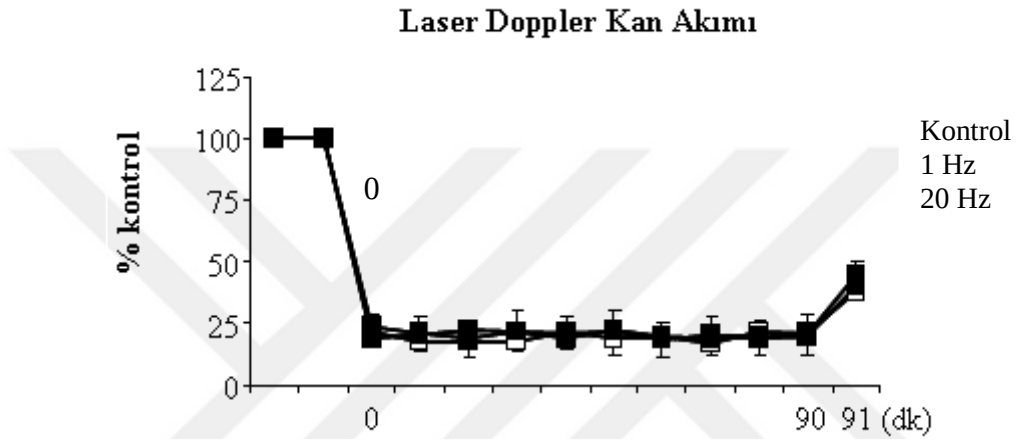
#### 5.11. İstatistik

Grupların aralarındaki istatistiksel farklılıkların tespiti için SPSS programı kullanımı tercih edilerek, istatistiksel test uygulandı. Tespit edilen farkların one-way ANOVA kullanımı yoluyla, LSD testiyle analizi yapıldı. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi, \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$ , ## $p < 0.01$  ve # $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak ifade edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1.Laser Doppler

90 dakika OSAT modelinin tekrar edilebilirliğini ve operasyonların başarısını kontrol etmek için OSA'in beslediği beyin bölgesinden (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) operasyonlar öncesinde, sırasında ve reperfüzyonun başlangıcından itibaren 1 dakika boyunca gerçek zamanlı olarak LDF kaydı alındı

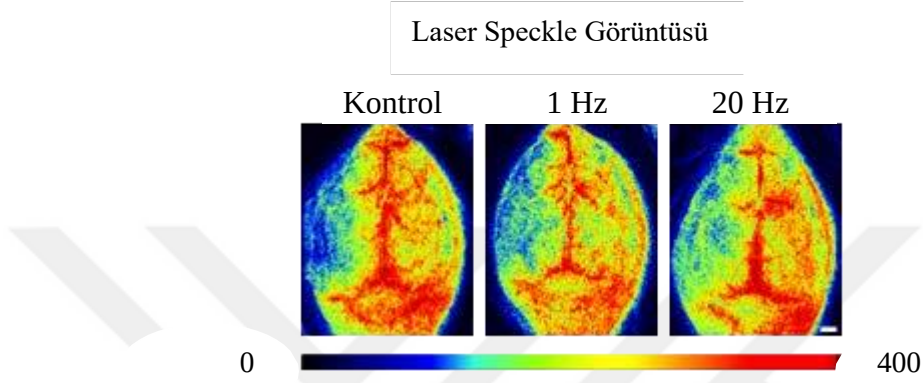


**Şekil 6.1.1.** Laser Doppler beyin kan akımı. OSAT modelinde hasarın 90 dakika ile sınırlandırıldığını ve beyin kan akımının % 80'nin altına düştüğünü göstermek için Laser Doppler sistemi kullanılarak beyin analizi yapıldı.

Filament yöntemi ile orta serebral arterin girişinin tıkanması sonucu bütün gruplarda striatum seviyesinde ki beyin kan akımının yaklaşık olarak % 80 oranında düştüğü gözlemlendi. Beyin felci sırasında beyin kan akımının sabit kaldığı ve filamentin geri çekilmesi ile kan akımını arttırdığı gözlemlendi. Hem beyin felci sırasında hem de reperfüzyonun başlangıcından itibaren geçen 1 dakika süre içerisinde beyin kan akımlarındaki artışta istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmedi.

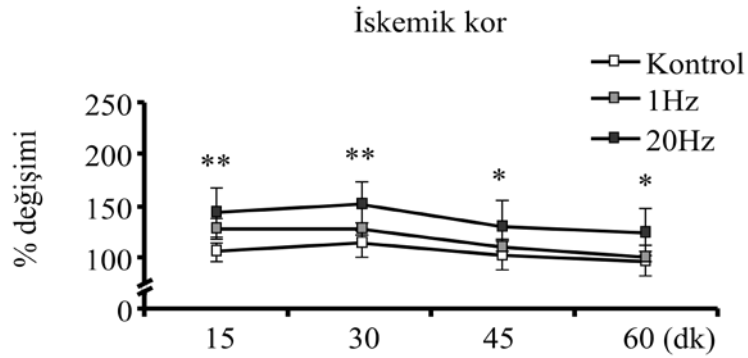
## 6.2. Laser Speckle Görüntüleme

90 dakika OSAT metodundan sonra farelere gruplarına göre 1 Hz, 20 Hz veya kontrol rTMS tedavileri uygulandı. rTMS tedavisinin beyin felci sonrası beyin mikrodolaşımı üzerine olan etkilerini araştırmak için Laser Speckle görüntüleme cihazı (PeriFlux Sistem 5000, Perimed, İsveç) kullanıldı.



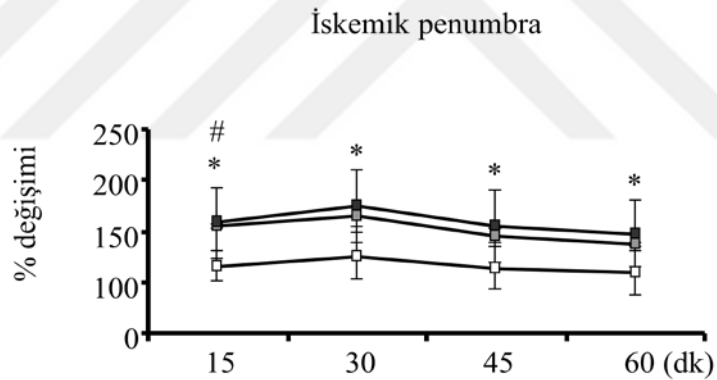
**Şekil 6.2.1.** 90 dakika OSAT modeli sonrası Laser Speckle görüntüsü

İskemiden sonra uygulanan rTMS tedavilerin hemen ardından farelerin korteksinden gerçek zamanlı olarak beyin kan akımı ölçümleri yapıldı. Beyin yüzeyinden 500 µm derinliğine inen laseri sayesinde iskemiden etkilenen iskemik kor, penumbra ve hasarsız korteks seviyelerinden ölçümler yapıldı.



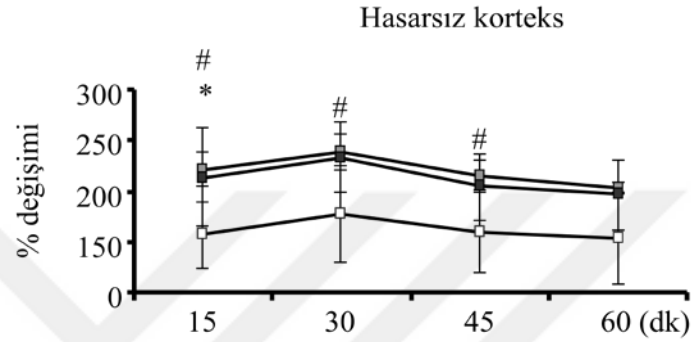
**Şekil 6.2.2.** 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen iskemik kor bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $**p<0.01$ / $*p<0.05$  kontrol grubu ile 20 Hz rTMS tedavi grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. İskemik kor bölgesinden alınan Laser Speckle görüntülerinin analizi sonrasında elde edilen sonuçlar: kontrol grubunda 15. dakikada  $104.58 \pm 9.27$ , 30. dakikada  $112.45 \pm 12.24$ , 45. dakikada  $101.18 \pm 14.24$ , 60. dakikada  $96.10 \pm 14.77$ 'dir. 1 Hz grubunda 15. dakikada  $127.91 \pm 9.50$ , 30. dakikada  $127.77 \pm 5.62$ , 45. dakikada  $108.72 \pm 7.69$  60. dakikada  $100.26 \pm 4.51$ 'dir. 20 Hz grubunda 15. dakikada  $142.15 \pm 24.09$ , 30. dakikada  $150.72 \pm 22.50$ , 45. dakikada  $129.49 \pm 24.09$ , 60. dakikada  $124.03 \pm 22.68$ 'dir. Elde edilen sonuçlara göre iskemik kor bölgesinde 20 Hz rTMS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 15. ve 30. dakikalarda  $p<0.01$ , 45 ve 60. dakikalarda ise  $p<0.05$  olacak şekilde kan akımını arttırdığı gözlemlenmektedir. 1 Hz grubu hem kontrol grubuna kıyasla hem de 20 Hz grubuna kıyasla iskemik kor bölgesinde kan akımı üzerine herhangi bir etkisi görülmemektedir.



**Şekil 6.2.3.** 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen iskemik penumbra bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $*p<0.05$  kontrol grubu ile 20 Hz grubu,  $^{\#}p<0.05$  1 Hz grubu ile 20 Hz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. İskemik penumbra bölgesinden alınan Laser Speckle görüntülerinin analizi sonrasında elde edilen sonuçlar: kontrol grubunda 15. dakikada  $115.58 \pm 14.72$ , 30. dakikada  $125.95 \pm 22.51$ , 45. dakikada  $113.99 \pm 20.43$ , 60. dakikada  $109.69 \pm 22.34$ 'dir. 1 Hz grubunda 15. dakikada  $154.93 \pm 1.22$ , 30. dakikada  $165.46 \pm 10.14$ , 45. dakikada  $145.76 \pm 7.28$ , 60. dakikada  $137.56 \pm 1.58$ 'dir.

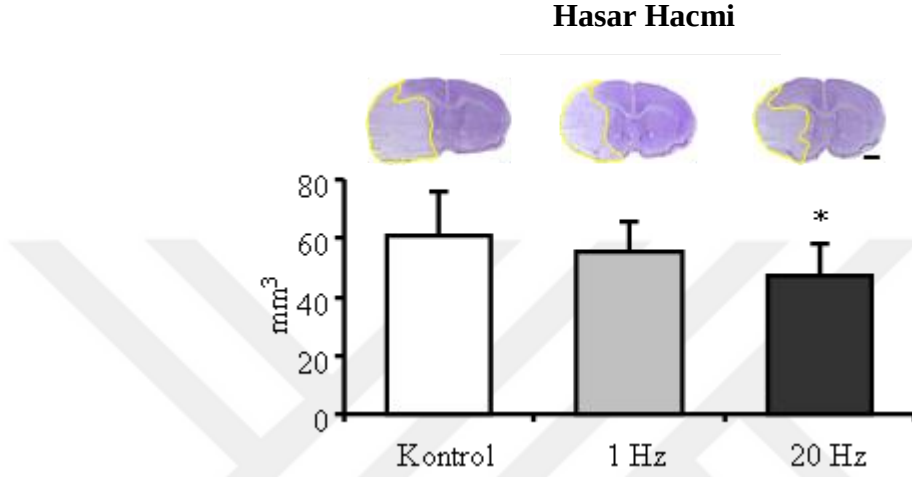
20 Hz grubunda 15. dakikada  $158.36 \pm 34.27$ , 30. dakikada  $174.61 \pm 35.18$ , 45. dakika da  $154.42 \pm 36.03$ , 60. dakikada  $147.96 \pm 32.23$ 'dir. Elde edilen sonuçlar 20 Hz grubunun penumbra bölgesindeki kan akımını Laser Speckle kaydı alınan 15, 30. 45. ve 60.dakikalarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı gözlemlenmektedir. Ayrıca 1 Hz rTMS uygulanan gruptaki kan akımının da 15. dakikada kontrol grubuna kıyasla arttığı göstermektedir.



**Şekil 6.2.4.** 90 dakika OSAT modeli sonrası uygulanan rTMS tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasarsız korteks bölgesine olan etkilerinin Laser Speckle görüntüleme tekniği ile analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  kontrol grubu ile 20 Hz grubu arasındaki, # $p < 0.05$  ise 1 Hz grubu ile 20 Hz grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. İskemik hasarsız korteksten alınan Laser Speckle görüntülerinin analizi sonrasında elde edilen sonuçlar: kontrol grubunda 15. dakikada  $156.69 \pm 32.28$ , 30. dakikada  $177.34 \pm 47.15$ , 45. dakikada  $160.25 \pm 41.37$ , 60. dakikada  $152.96 \pm 44.62$ 'dir. 1 Hz grubunda 15. dakikada  $221.64 \pm 17.40$ , 30. dakikada  $239.44 \pm 17.79$ , 45. dakikada  $214.90 \pm 14.93$ , 60. dakikada  $203.89 \pm 4.75$ 'dir. 20 Hz grubunda 15. dakikada  $213.03 \pm 48.41$ , 30. dakikada  $233.51 \pm 35.26$ , 45. dakikada  $204.51 \pm 32.61$ , 60. dakikada  $196.21 \pm 34.31$ 'dir. Elde edilen sonuçlar 20 Hz grubunun hasarsız kortekste bölgesel kan akımını kontrol grubuna kıyasla 15. dakikada istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı gözlemlenmektedir. 1 Hz rTMS uygulanan gruptaki kan akımının 15. 30. ve 45.dakikalarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığını göstermektedir.

### 6.3. Hasar Hacmi

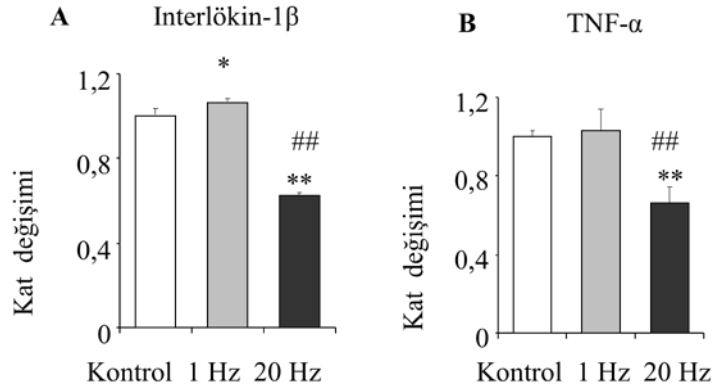
Oluşturulan 90 dakika iskemi modeli OSAT sonrası, elde edilen 18 µm kalınlığındaki koronal beyin kesitlere hasar hacminin analizi için creysl violet boyaması yapıldı. Boyanan kesitlerden hasar hacmi image J programı kullanılarak hesaplandı.



**Şekil 6.3.1.** 90 dakika deneysel iskemi modeli sonrasında hasar hacminin Cresyl violet boyaması ile değerlendirilmesi.

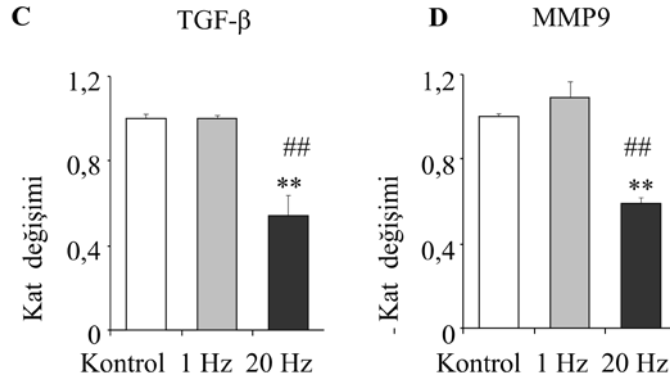
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubu ile 20 Hz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Beyin felci sonrası oluşan hasar hacmi değerlendirmesi, kontrol grubunda  $60.65 \pm 14.99$  1 Hz grubunda  $55.12 \pm 10.27$ , 20 Hz grubunda  $47.36 \pm 11.00$ 'dir. Elde edilen sonuçlara göre 20 Hz rTMS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hasar hacmini istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede azalttığını göstermektedir. 1 Hz rTMS uygulanmasının ise hasar hacmi üzerine istatistiksel olarak farklı bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

#### 6.4. İskemi Sonrası Gen Seviyesindeki Analizler



**Şekil 6.4.1.** 90 dakika OSAT sonrasında IL-1β ve TNF-α ekspresyonuna etkisi.

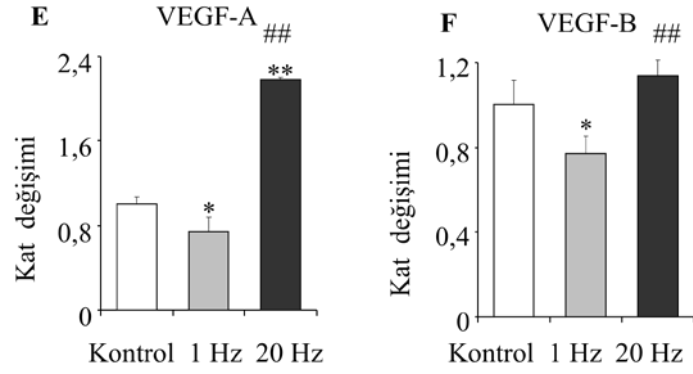
İskemi sonrası gen seviyesindeki değişiklikler QPCR metodu kullanılarak değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre interlökin-1 beta'nın (IL-1β) gen seviyesi kontrol grubunda  $1 \pm 0.03$  kat, 1 Hz grubunda  $1.07 \pm 0.01$  kat ve 20 Hz grubunda  $0.62 \pm 0.02$  kat olarak bulundu. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.03$ , 1 Hz grubunda  $1.03 \pm 0.11$  ve 20 Hz grubunda  $0.66 \pm 0.09$  olarak bulundu. Kontrol grubuna kıyasla IL-1β ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır, 20 Hz grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmektedir. 20 Hz grubunda IL-1β protein seviyesi 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı gözlemlenmektedir. Kontrol grubuna göre TNF-α ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 20 Hz grubu 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır.



**Şekil 6.4.2.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin TGFβ ve MMP-9 ekspresyonuna etkisi.

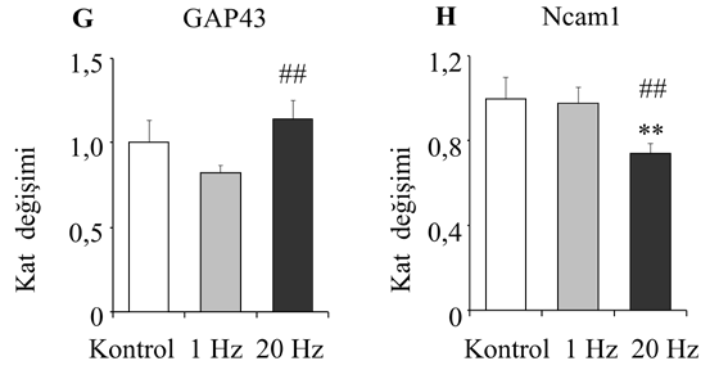
Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $**p < 0.01$  kontrol grubuyla kıyaslandığında,  $^{##}p < 0.01$  1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Transforming growth factor beta (TGFβ) ve Matrix metallo-proteinase-9 (MMP-9) gen seviyesinde qPCR yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre TGFβ kontrol grubunda  $1.0 \pm 0.02$ , 1 Hz grubunda  $1 \pm 0.01$ , ve 20 Hz grubunda  $0.55 \pm 0.09$  olarak bulundu. MMP-9 seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.01$ , 1 Hz grubunda  $1.09 \pm 0.08$  ve 20 Hz grubunda  $0.59 \pm 0.03$  olarak bulundu. Kontrol grubuna kıyasla TGF-β ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik görülmemesine rağmen, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubu, 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmaktadır, 20 Hz grubu 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MMP-9 ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubu, 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubu 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır.





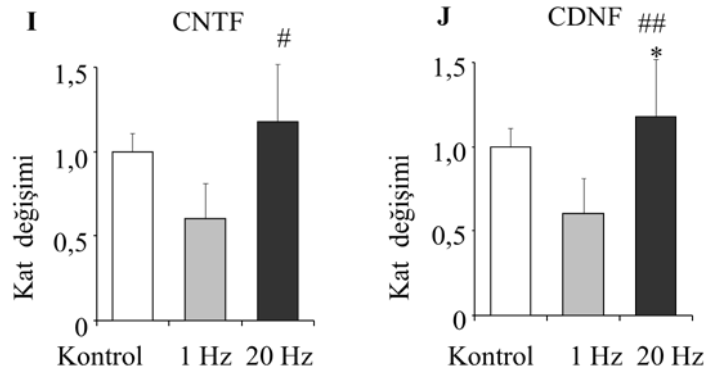
**Şekil 6.4.3.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin VEGF-A ve VEGF-B ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. \*\* $p < 0.01$ / \* $p < 0.05$  kontrol grubuna göre, ## $p < 0.01$ , 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Vasküler endotelyal büyüme faktörleri (VEGF), VEGF-A ve VEGF-B gen seviyesinde qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre VEGF-A kontrol grubunda  $1.0 \pm 0.06$ , 1 Hz grubunda  $0.73 \pm 0.15$ , ve 20 Hz grubunda  $2.17 \pm 0.03$  olarak bulundu. VEGF-B seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.12$ , 1 Hz grubunda  $0.77 \pm 0.08$  ve 20 Hz grubunda  $1.14 \pm 0.08$  olarak bulundu. Kontrol grubunda karşılaştırıldığında VEGF-A ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. 1 Hz grubunda, 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında VEGF-B ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. 1 Hz grubunda, 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır.



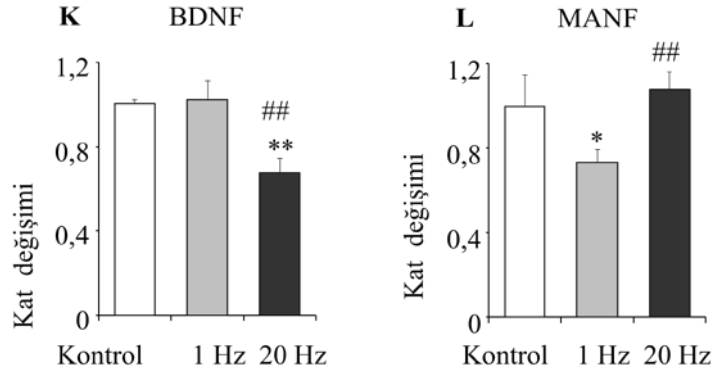
**Şekil 6.4.4.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin GAP43 ve Ncam1 ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.  $**p<0.01$  kontrol grubuna göre,  $^{##}p<0.01$ , 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Growth Associated Protein-43 (GAP43) ve Ncam1 gen seviyesinde qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre GAP43 kontrol grubunda  $1 \pm 0.13$ , 1 Hz grubunda  $0.83 \pm 0.04$  ve 20 Hz grubunda  $1.14 \pm 0.11$  olarak bulundu. Ncam1 seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.10$  1 Hz grubunda  $0.98 \pm 0.07$  ve 20 Hz grubunda  $0.74 \pm 0.05$  olarak bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında GAP43 ekspresyonu, 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Ncam1 ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik görülmedi, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır.



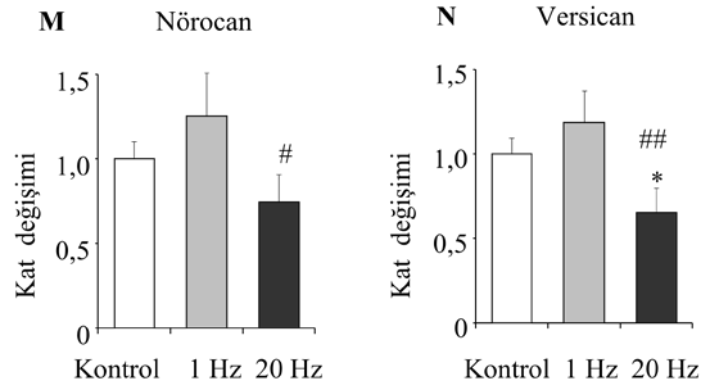
**Şekil 6.4.5.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin CNTF ve CDNF ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna göre, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Siliyar Nörotrofik Faktör (CNTF) ve Serebral dopamin nörotrofik faktör (CDNF) gen seviyesinde qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre CNTF kontrol grubunda  $1 \pm 0.11$ , 1 Hz grubunda  $1.61 \pm 0.20$  ve 20 Hz grubunda  $1.17 \pm 0.34$  olarak bulundu. CDNF seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.63$ , 1 Hz grubunda  $0.69 \pm 0.09$  ve 20 Hz grubunda  $2.14 \pm 0.41$  olarak bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında CNTF ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre anlamlı bir şekilde artmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır.



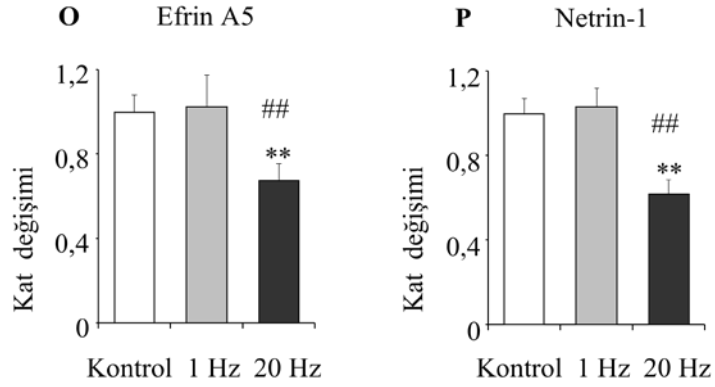
**Şekil 6.4.6.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin BDNF ve MANF ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\*p < 0.01/ \*p < 0.05 kontrol grubuna göre, ##p < 0.01 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve Mezensefalik astrosit kaynaklı nörotrofik faktör (MANF) gen seviyesindeki değişiklikler qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre BDNF kontrol grubunda  $1 \pm 0.02$ , 1 Hz grubunda  $1.02 \pm 0.09$  ve 20 Hz grubunda  $0.67 \pm 0.07$  olarak bulundu. MANF seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.15$ , 1 Hz grubunda  $0.73 \pm 0.06$  ve 20 Hz grubunda  $1.08 \pm 0.08$  olarak bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında BDNF ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kontrole grubuna göre karşılaştırıldığında MANF ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır.



**Şekil 6.4.7.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin Nörocan ve Versican ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna göre, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Nörocan ve Versican gen seviyesindeki değişiklikler qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre Nörocan kontrol grubunda  $1 \pm 0.10$ , 1 Hz grubunda  $1.25 \pm 0.25$  ve 20 Hz grubunda  $0.75 \pm 0.16$  olarak bulundu. Versican seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.09$ , 1 Hz grubunda  $1.19 \pm 0.19$  ve 20 Hz grubunda  $0.66 \pm 0.14$  olarak bulundu. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Versican ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır.



**Şekil 6.4.8.** 1 Hz ve 20 Hz rTMS tedavisinin Efrin A5 ve Netrin-1 ekspresyonuna etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.  $**p < 0.01$  kontrol grubuna göre,  $^{##}p < 0.01$  1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. 90 dakika OSAT sonrasında Efrin A5 ve Netrin-1 gen seviyesindeki değişiklikler qPCR metodu kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre Efrin A5 kontrol grubunda  $1 \pm 0.08$ , 1 Hz grubunda  $1.02 \pm 0.15$  ve 20 Hz grubunda  $0.67 \pm 0.08$  olarak bulundu. Netrin-1 seviyesi ise kontrol grubunda  $1 \pm 0.07$ , 1 Hz grubunda  $1.03 \pm 0.09$  ve 20 Hz grubunda  $0.62 \pm 0.07$  olarak bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Efrin A5 ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak bir şekilde artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Netrin-1 ekspresyonu 1 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. 1 Hz grubunda 20 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artmaktadır, 20 Hz grubunda 1 Hz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır.

## 7. TARTIŞMA

Bu tezde akut inme tedavisi için seçilen rTMS tedavisinin, inme sonrası i) serebral kanlanmaya, ii) hasar hacmine, iii) damar oluşumu ile ilgili genlere, iv) plastisiteyi tetikleyen ve hücresel yaşam üzerinde etkili genlere ve v) enflamasyon üzerinde etkili genlere etkisini araştırmak amaçlandı. rTMS tedavisinin kullanım kolaylığı, uygulamanın ağrısız olması, invazif olmaması, uygulanan frekansın uyarıcı ya da inhibe edici olarak ayarlanabilmesi, inme sonrası hemisferler arasındaki düzeni tekrar sağlayabilmesi tedavinin kullanımını artırmaktadır. Araştırmalar sonucunda, rTMS tedavisinde ciddi bir yan etkiye rastlanmadı. Yan etki olarak rTMS tedavisi sonrası, hafif derecede baş ağrısı gözlemlenmiştir (91). Yapılan çalışmalar neticesinde, rTMS tedavisinin etkilerinin sadece akut inme tedavisiyle sınırlı olmayıp, kronik inme tedavisinde de etkili olduğu görülmektedir. rTMS uygulamaları beyinde bölgesel bir alana odaklanıp, manyetik uyarımlar gerçekleştirmektedir (92, 93). Uygulan düşük frekanslı rTMS tedavisi motor korteksin uyarılabilirliğini baskılayarak, inhibe edici bir özellik göstermektedir. Yüksek frekanslı rTMS tedavisi, kortikal uyarımı artırabilecek bir özellik göstermektedir (93). Uygulanan yüksek frekanslı rTMS tedavisinin amacı, inmeye bağlı olarak etkilenen hemisferler arası düzeni tekrar sağlamaktır. Kronik fazda nöronal plastisite üzerinde etkili olduğu düşünülen rTMS, akut fazda nöronal hasarın artışını engellemektedir (94). Yüksek frekanslı rTMS tedavisi sonrası, enflamasyonu artıran genlerin ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. . rTMS tedavisi nöronal sağkalımı artırmıştır ayrıca glial hücrelerde, astrositlerde ve mikrogliyalarda da etki göstermiştir. rTMS tedavisinin, iskemi sonrası moleküler mekanizmalardaki etkilerini araştırmak için 90 dakika serebral deneysel iskemi modeli OSAT oluşturuldu. İskemi modeli oluşturulduktan sonra LDF cihazı kullanılarak reperfüzyon başlangıcında 1 dakika serebral kan akımı kaydı alındı. Kullanılan LDF cihazı (yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>) kanlanma hakkında fikir vermektedir (110). Hasar hacminin tespiti için kullanılan Creysl violet boyaması nöronal dejenerasyonların, nöronal kaybın belirlenmesi için tercih edildi. qPCR gen analizi rTMS tedavisi sonrası gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri saptamak amacıyla tercih edildi. Reperfüzyonun 1. dakikasında 10 dakika boyunca rTMS tedavisi uygulandı ve sonrasında 60 dakika boyunca Laser Speckle cihazı yardımıyla lokal serebral kan akımı değişiklikleri kaydedildi. Laser Speckle cihazı

kullanılarak CCD kamera yardımıyla laser ışığının yoğunlaştığı noktalarda kan akımı kaydedildi. Oluşturulan 90 dakika deneysel iskemi modelinin doğruluğunu teyit etmek için, LDF cihazı kullanıldı. Beyin kan akışındaki düşüş elde edilen anlık serebral kan akımı verilerine göre analiz edildi. Yüksek frekanslı rTMS tedavi grubunda enflamasyon, sinaptik plastisite, trofik faktörler ve anjiyogenez ile ilgili birçok gende önemli değişiklikler olduğunu gözlemledik. BDNF, nöronal plastisite gelişiminde rol oynayan, hafızayla ilişkili bir gendir (95). Nöronların yaşamsal fonksiyonlarının devam ettirilmesinde, nöronal gelişimde, sinaptik aktivitelerde görevlidir. Beynin fonksiyonelliğinin korunmasında önemlidir (96). Beyinde en çok bulunan nörotrofindir. Deneysel hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda nöroprotektif etki göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, iskemik hasar sonrası BDNF seviyesinin arttığı görülmektedir (97). Yüksek frekanslı rTMS tedavi uygulamalarının ardından, BDNF gen ekspresyonunun arttığı görüldü (98, 99). Uygulanan rTMS tedavisi sonrası BDNF seviyesi, 1 Hz rTMS tedavisinde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artış gösterirken, 20 Hz tedavisi sonrası, kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. CDNF geni, dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu engellemektedir. (100). CDNF'nin nöronal plastisiteyi destekleyici etkileri vardır ve hücrenin yaşamsal fonksiyonlarında rol oynar. 1 Hz rTMS tedavisi sonrası nöronal plastisiteyi tetikleyen CDNF seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmayacak bir şekilde azalırken, 20 Hz tedavisi sonrası CDNF seviyesi kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. GAP43 aksonal gelişim ve onarımında görevli bir gendir. Hasar oluşumuyla birlikte GAP43 seviyesinde artış görülmektedir. İskemik hasar sürecinde GAP43 penumbra artış göstermektedir. Hasarın ardından 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir (101). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası aksonal büyümede görevli GAP43 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalmaktadır, 20 Hz tedavisi sonrası kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde CDNF seviyesi artış göstermektedir. CNTF, merkezi sinir sisteminde ekspresyon seviyesi az olan, nöronal sitokinlerdir. Nöronal hasar sonrası hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Artan CNTF nöronal korumada görev almaktadır (102). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası nöronal korumada görevli CNTF seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmayacak bir şekilde azalırken, 20 Hz tedavisi sonrası CNTF seviyesi 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. MANF geni,



iskemi sonrası tetiklenen apoptozun engellenmesini sağlayarak, nöronal korumada etki göstermektedir. MANF seviyesi iskemi ardından artış göstermektedir (103). 1 Hz rTMS tedavisi iskemi sonrası tetiklenen apoptozun inhibisyonunda görevli MANF seviyesini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltırken, 20 Hz tedavisi MANF seviyesini 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmaktadır. IL -1 $\beta$  hücre dışı matriksin (HDM) yenilenmesinde rol alır, enflamatuvar cevap oluşturur. İnterlökin-1 $\beta$  endotel hücre aktivasyonunda görevlidir (104). Endotel hücre aktivasyonunda görevli IL-1 $\beta$ 'nın gen seviyesi, 1 Hz rTMS tedavisi sonrası kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmasına rağmen , 20 Hz rTMS tedavisi sonrası IL-1 $\beta$  gen seviyesi kontrol ve 1 Hz gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. TNF- $\alpha$  enflamatuvar kaskadın başlatılmasında rol oynar. İskemi sonrası, kan beyin bariyerinin (KBB) koruyucu yapısında bozulmalara neden olur. TNF- $\alpha$  ekspresyonunun azaltılması hasar hacmini azaltmaktadır. TNF- $\alpha$  ekspresyonu enflamasyonu ve apoptozu tetikleyebilir (105). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası, pro-enflamatuvar ve pro-apoptik etki gösteren TNF- $\alpha$  ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artış gösterirken, TNF- $\alpha$  ekspresyonu 20 Hz tedavisi sonrası kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. TGF $\beta$  nöronal korumada görevli ve anti-enflamatuvar etki gösteren sitokinlerdir (106). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası TGF $\beta$  ekspresyonu istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik görülmemesine rağmen 20 Hz tedavisi sonrası TGF $\beta$  ekspresyonu kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. VEGF-A ve VEGF-B iskemi sonrası damar onarımında, nöronal korumada, nöronal yenilenme rol oynar (107). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası iskemi sonrası tetiklenen damar ve nöronal onarımda görevli VEGF-A ve VEGF-B seviyesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken, 20 Hz tedavisi sonrası VEGF-A ve VEGF-B gen seviyesi 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır. MMP-9, kan beyin bariyerinin yapısal bütünlüğünün bozulmasını tetikler (108). 1 Hz rTMS tedavisi sonrası kbb yapısının bozulmasını sağlayan MMP-9 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmayacak bir şekilde artış gösterirken, 20 Hz tedavisi sonrası MMP-9, ekspresyonu Kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. rTMS tedavisinin nöronal iyileşmeye ve nöronal onarıma olan etkileri incelendi. Nöronal onarım için, CNTF ve VEGF gen ekspresyon değişiklikleri incelendi. VEGF geni

vasküler onarımda yer alan bir gendir (110). VEGF dopaminerjik nöronların korunmasında rol oynamakta ve nöronal korumayı desteklemektedir (111). rTMS tedavisinin nörotrofik/büyüme faktörlerinin gen ekspresyonu üzerindeki değişiklikleri belirlemek için, BDNF, GDNF, VEGFA ve VEGF-B genleri analiz edildi. BDNF, GDNF, VEGF-A ve VEGF-B gen ekspresyonları rTMS tedavisi sonrası kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. BDNF geni nöronal gelişim ve plastisitede önemli bir gendir. Hasar sonrası BDNF gen ekspresyonu üzerinde yapılacak incelemeler, nöronal plastisite hakkında bilgi sağlayabilir (109). Bu doğrultuda rTMS tedavisinin nöronal plastisiteyi destekleyici yönde etki gösterebilir. Ayrıca yapılan çalışmalar, yüksek frekanslı rTMS uygulamalarının BDNF gen seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığını göstermektedir. Buna rağmen çalışmalarımız sonucunda BDNF gen seviyesi, 1 Hz seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde artış gösterirken, 20 Hz rTMS tedavisinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Bu farklı sonuçlar, rTMS tedavi uygulamasının farklılıkları (zaman ve frekans), tercih edilen deneysel hayvan modellerinin farklı olmasından dolayı meydana gelmiş olabilir. 20 Hz rTMS tedavisi sonrası fonksiyonel geri kazanımın arttığı gözlenmektedir ve hasar hacminde azalma meydana gelmektedir. Bu tez çalışmasında uygulanan 20 rTMS tedavisi Kontrol ve 1 Hz grubuna kıyasla hasar sonrası enflamasyon ile ilgili gen seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmekte , vasküler regülasyon, plastisite ve hücrel yaşam ile ilgili gen seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı görülmektedir. rTMS tedavisi sinyal yolları üzerinde ve endojen tamir mekanizmaları üzerinde etki gösterip, gen ekspresyon seviyesinde değişikliklere neden olabilir. Hasar sonrası rTMS uygulamaları moleküler biyosentezin tetiklenmesini sağlayarak, nörotrofik büyüme faktörlerinde artışa neden olabilir.

## 8. SONUÇ

Tüm bu datalar incelendiğinde, iskemi sonrası reperfüzyon başlangıcında uygulanan 20 Hz rTMS tedavisinin serebral kanlanmayı artırdığı, kanlanmanın artmasına bağlı olarak hasar hacmini azalttığı görülmektedir.

Enflamasyonla artış gösteren IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$  gen seviyelerini 20 Hz rTMS tedavisi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmaktadır. Vasküler regülasyonu sağlayan genlerden VEGF-A ve VEGF-B istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmasına rağmen, endotel bütünlüğü olumsuz etkileyen MMP-9 gen seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmaktadır. Plastisiteyi engelleyen Efrin A5, Versican, Nörocan, Netrin-1 gen seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmaktadır. Plastisiteyi uyaran hücre yaşamı üzerine etkili CDNF, CNTF, GAP43, MANF'ın gen seviyelerini olarak anlamlı bir şekilde artırmaktadır. BDNF seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmektedir.

Uygulanan 20 Hz rTMS tedavisinin inme sonrası moleküler mekanizmalar üzerine iyi sonuçlar getirdiği düşünülmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *Journal of clinical epidemiology* 41, 105-114. (1988).
2. Albers, GW, Caplan, LR, Easton, JD, Fayad, PB, Mohr, JP, Saver, JL, et al. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *The New England journal of medicine* 347, 1713-1716. (2002).
3. Adams, HP, Jr., Bendixen, BH, Kappelle, LJ, Biller, J, Love, BB, Gordon, DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35-41. (1993).
4. Roger, VL, Go, AS, Lloyd-Jones, DM, Adams, RJ, Berry, JD, Brown, TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18-e209. (2011).
5. Karaszewski, B, Wardlaw, JM, Marshall, I, Cvorovic, V, Wartolowska, K, Haga, K, et al. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology* 132, 955-964. (2009).
6. Hata, R, Maeda, K, Hermann, D, Mies, G, and Hossmann, KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 937-946. (2000).
7. Hata, R, Maeda, K, Hermann, D, Mies, G, and Hossmann, KA. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 306-315. (2000).
8. Mies, G, Ishimaru, S, Xie, Y, Seo, K, and Hossmann, KA. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 11, 753-761. (1991).
9. Olsen, TS, Langhorne, P, Diener, HC, Hennerici, M, Ferro, J, Sivenius, J, et al. European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management--update 2003. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 16, 311-337. (2003).
10. Kulkens, S, and Hacke, W. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke: review of SITS-MOST and other Phase IV studies. *Expert review of neurotherapeutics* 7, 783-788. (2007).
11. Garber, K. Stroke treatment--light at the end of the tunnel? *Nature biotechnology* 25, 838-840. (2007).
12. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 333, 1581-1587. (1995).
13. Adams, HP, Jr., del Zoppo, G, Alberts, MJ, Bhatt, DL, Brass, L, Furlan, A, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association

- Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* 38, 1655-1711. (2007).
14. Rink, C, Roy, S, Khan, M, Ananth, P, Kuppusamy, P, Sen, CK, et al. Oxygen-sensitive outcomes and gene expression in acute ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 1275-1287. (2010).
  15. Davies, CA, Loddick, SA, Toulmond, S, Stroemer, RP, Hunt, J, and Rothwell, NJ. The progression and topographic distribution of Interleukin 1 beta-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19, 87-98. (1999).
  16. Zheng, Z, and Yenari, MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurological research* 26, 884-892. (2004).
  17. Hossmann, KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and molecular neurobiology* 26, 1057-1083. (2006).
  18. Candelario-Jalil, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 10, 644-654. (2009).
  19. Taylor, CP, Burke, SP, and Weber, ML. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *Journal of neuroscience methods* 59, 121-128. (1995).
  20. Monyer, H, Sprengel, R, Schoepfer, R, Herb, A, Higuchi, M, Lomeli, H, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science (New York, N.Y.)* 256, 1217-1221. (1992).
  21. Aarts, MM, and Tymianski, M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Current molecular medicine* 4, 137-147. (2004).
  22. Betz, AL, Ennis, SR, and Schielke, GP. Blood-brain barrier sodium transport limits development of brain edema during partial ischemia in gerbils. *Stroke* 20, 1253-1259. (1989).
  23. Garcia, JH, Liu, KF, Yoshida, Y, Chen, S, and Lian, J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *The American journal of pathology* 145, 728-740. (1994).
  24. Orrenius, S, Zhivotovsky, B, and Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 552-565. (2003).
  25. Penn, RD, and Loewenstein, WR. Uncoupling of a nerve cell membrane junction by calcium-ion removal. *Science (New York, N.Y.)* 151, 88-89. (1966).

26. Nakanishi, N, Tu, S, Shin, Y, Cui, J, Kurokawa, T, Zhang, D, et al. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 5260-5265. (2009).
27. Hara, MR, and Snyder, SH. Cell signaling and neuronal death. *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, 117-141. (2007).
28. McCracken, E, Valeriani, V, Simpson, C, Jover, T, McCulloch, J, and Dewar, D. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 1529-1536. (2000).
29. Schinder, AF, Olson, EC, Spitzer, NC, and Montal, M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6125-6133. (1996).
30. Antonsson, B, Conti, F, Ciavatta, A, Montessuit, S, Lewis, S, Martinou, I, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science (New York, N.Y.)* 277, 370-372. (1997).
31. Park, CK, Nehls, DG, Graham, DI, Teasdale, GM, and McCulloch, J. The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology* 24, 543-551. (1988).
32. Vierbuchen, M, Gunawan, J, and Debuch, H. Studies on the hydrolysis of 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine in subcellular fractions of rat brain. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 360, 1091-1097. (1979).
33. Sokoloff, L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochemical research* 24, 321-329. (1999).
34. Mehta, SL, Manhas, N, and Raghubir, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54, 34-66. (2007).
35. Castillo, J, Loza, MI, Mirelman, D, Brea, J, Blanco, M, Sobrino, T, et al. A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36, 292-301. (2016).
36. Harston, GW, Sutherland, BA, Kennedy, J, and Buchan, AM. The contribution of L-arginine to the neurotoxicity of recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischemia: a review of rtPA neurotoxicity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 1804-1816. (2010).
37. Pellegrini-Giampietro, DE, Gorter, JA, Bennett, MV, and Zukin, RS. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends in neurosciences* 20, 464-470. (1997).
38. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22, 391-397. (1999).
39. Chan, PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27, 1124-1129. (1996).

40. Klatzo, I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta neuropathologica* 72, 236-239. (1987).
41. Loh, KP, Huang, SH, De Silva, R, Tan, BK, and Zhu, YZ. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Current Alzheimer research* 3, 327-337. (2006).
42. Coyle, JT, and Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)* 262, 689-695. (1993).
43. Iwasa, K, Tasaki, I, and Gibbons, RC. Swelling of nerve fibers associated with action potentials. *Science (New York, N.Y.)* 210, 338-339. (1980).
44. Tei, H, Uchiyama, S, Ohara, K, Kobayashi, M, Uchiyama, Y, and Fukuzawa, M. Deteriorating ischemic stroke in 4 clinical categories classified by the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* 31, 2049-2054. (2000).
45. Kochanek, KD, Xu, J, Murphy, SL, Minino, AM, and Kung, HC. Deaths: final data for 2009. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System* 60, 1-116. (2011).
46. Hacke, W, Schwab, S, Horn, M, Spranger, M, De Georgia, M, and von Kummer, R. 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Archives of neurology* 53, 309-315. (1996).
47. Granger, DN, and Kubes, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of leukocyte biology* 55, 662-675. (1994).
48. Ito, J, Marmarou, A, Barzo, P, Fatouros, P, and Corwin, F. Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* 84, 97-103. (1996).
49. Unterberg, AW, Stover, J, Kress, B, and Kiening, KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129, 1021-1029. (2004).
50. Nedergaard, M, and Astrup, J. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 6, 607-615. (1986).
51. Taylor, RC, Cullen, SP, and Martin, SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 231-241. (2008).
52. Vaux, DL, Cory, S, and Adams, JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442. (1988).
53. Oltvai, ZN, Millman, CL, and Korsmeyer, SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619. (1993).
54. Joza, N, Susin, SA, Dugas, E, Stanford, WL, Cho, SK, Li, CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554. (2001).
55. Culmsee, C, and Mattson, MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 761-777. (2005).
56. Culmsee, C, Zhu, C, Landshamer, S, Becattini, B, Wagner, E, Pellecchia, M, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and

- focal cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 10262-10272. (2005).
57. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516. (2007).
  58. Eldadah, BA, and Faden, AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *Journal of neurotrauma* 17, 811-829. (2000).
  59. Loddick, SA, MacKenzie, A, and Rothwell, NJ. An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. *Neuroreport* 7, 1465-1468. (1996).
  60. Kohda, K, Wang, Y, and Yuzaki, M. Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nature neuroscience* 3, 315-322. (2000).
  61. Gursoy-Ozdemir, Y, Bolay, H, Saribas, O, and Dalkara, T. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 31, 1974-1980; discussion 1981. (2000).
  62. Shin, HK, Dunn, AK, Jones, PB, Boas, DA, Lo, EH, Moskowitz, MA, et al. Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain : a journal of neurology* 130, 1631-1642. (2007).
  63. Danton, GH, and Dietrich, WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62, 127-136. (2003).
  64. Kreutzberg, GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19, 312-318. (1996).
  65. Kuroda, S, and Siesjo, BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clinical neuroscience (New York, N.Y.)* 4, 199-212. (1997).
  66. Zahuranec, DB, and Majersik, JJ. Percentage of acute stroke patients eligible for endovascular treatment. *Neurology* 79, S22-25. (2012).
  67. Whiteley, WN, Emberson, J, Lees, KR, Blackwell, L, Albers, G, Bluhmki, E, et al. Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis. *The Lancet. Neurology* 15, 925-933. (2016).
  68. Shah, J. Hyperbaric oxygen therapy. *The journal of the American College of Certified Wound Specialists* 2, 9-13. (2010).
  69. Weaver, LK, Hopkins, RO, Chan, KJ, Churchill, S, Elliott, CG, Clemmer, TP, et al. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *The New England journal of medicine* 347, 1057-1067. (2002).
  70. Sjoberg, F, and Singer, M. The medical use of oxygen: a time for critical reappraisal. *Journal of internal medicine* 274, 505-528. (2013).
  71. Thom, SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 106, 988-995. (2009).
  72. Yenari, M, Kitagawa, K, Lyden, P, and Perez-Pinzon, M. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke* 39, 2910-2917. (2008).
  73. Lyden, PD, Hemmen, TM, Grotta, J, Rapp, K, and Raman, R. Endovascular therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ICTuS 2/3 protocol.



- International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society 9, 117-125. (2014).
74. Hummel, FC, and Cohen, LG. Non-invasive brain stimulation: a new strategy to improve neurorehabilitation after stroke? *The Lancet. Neurology* 5, 708-712. (2006).
75. Zangen, A, Roth, Y, Voller, B, and Hallett, M. Transcranial magnetic stimulation of deep brain regions: evidence for efficacy of the H-coil. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 116, 775-779. (2005).
76. Khedr, EM, and Abo-Elfetoh, N. Therapeutic role of rTMS on recovery of dysphagia in patients with lateral medullary syndrome and brainstem infarction. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81, 495-499. (2010).
77. Verin, E, and Leroi, AM. Poststroke dysphagia rehabilitation by repetitive transcranial magnetic stimulation: a noncontrolled pilot study. *Dysphagia* 24, 204-210. (2009).
78. Pal, PK, Hanajima, R, Gunraj, CA, Li, JY, Wagle-Shukla, A, Morgante, F, et al. Effect of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on interhemispheric inhibition. *Journal of neurophysiology* 94, 1668-1675. (2005).
79. Fregni, F, Freedman, S, and Pascual-Leone, A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *The Lancet. Neurology* 6, 188-191. (2007).
80. Khedr, EM, Etraby, AE, Hemeda, M, Nasef, AM, and Razek, AA. Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke. *Acta neurologica Scandinavica* 121, 30-37. (2010).
81. Ameli, M, Grefkes, C, Kemper, F, Riegg, FP, Rehme, AK, Karbe, H, et al. Differential effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation over ipsilesional primary motor cortex in cortical and subcortical middle cerebral artery stroke. *Annals of neurology* 66, 298-309. (2009).
82. Hausmann, A, Weis, C, Marksteiner, J, Hinterhuber, H, and Humpel, C. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation enhances c-fos in the parietal cortex and hippocampus. *Brain research. Molecular brain research* 76, 355-362. (2000).
83. Kirton, A, Chen, R, Friefeld, S, Gunraj, C, Pontigon, AM, and Deveber, G. Contralesional repetitive transcranial magnetic stimulation for chronic hemiparesis in subcortical paediatric stroke: a randomised trial. *The Lancet. Neurology* 7, 507-513. (2008).
84. Liepert, J, Graef, S, Uhde, I, Leidner, O, and Weiller, C. Training-induced changes of motor cortex representations in stroke patients. *Acta neurologica Scandinavica* 101, 321-326. (2000).
85. Murase, N, Duque, J, Mazzocchio, R, and Cohen, LG. Influence of interhemispheric interactions on motor function in chronic stroke. *Annals of neurology* 55, 400-409. (2004).
86. Tomaiuolo, F, Voci, L, Bresci, M, Cozza, S, Posteraro, F, Oliva, M, et al. Selective visual neglect in right brain damaged patients with splenial

- interhemispheric disconnection. *Experimental brain research* 206, 209-217. (2010).
87. Kim, YH, You, SH, Ko, MH, Park, JW, Lee, KH, Jang, SH, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation-induced corticomotor excitability and associated motor skill acquisition in chronic stroke. *Stroke* 37, 1471-1476. (2006).
  88. Sutherland, BA, Minnerup, J, Balami, JS, Arba, F, Buchan, AM, and Kleinschnitz, C. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7, 407-418. (2012).
  89. Hermann, DM, and Bassetti, CL. Neuroprotection in the SAINT-II aftermath. *Annals of neurology* 62, 677-678; author reply 678. (2007).
  90. Geurts, M, Petersson, J, Brizzi, M, Olsson-Hau, S, Luijckx, GJ, Algra, A, et al. COOLIST (Cooling for Ischemic Stroke Trial): A Multicenter, Open, Randomized, Phase II, Clinical Trial. *Stroke* 48, 219-221. (2017).
  91. Khedr, EM, Ahmed, MA, Fathy, N, and Rothwell, JC. Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. *Neurology* 65, 466-468. (2005).
  92. Di Lazzaro, V, Profice, P, Pilato, F, Dileone, M, Oliviero, A, and Ziemann, U. The effects of motor cortex rTMS on corticospinal descending activity. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 121, 464-473. (2010).
  93. Funke, K, and Benali, A. Modulation of cortical inhibition by rTMS - findings obtained from animal models. *The Journal of physiology* 589, 4423-4435. (2011).
  94. Rodger, J, and Sherrard, RM. Optimising repetitive transcranial magnetic stimulation for neural circuit repair following traumatic brain injury. *Neural regeneration research* 10, 357-359. (2015).
  95. Cowansage, KK, LeDoux, JE, and Monfils, MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current molecular pharmacology* 3, 12-29. (2010).
  96. Yoshii, A, and Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental neurobiology* 70, 304-322. (2010).
  97. Madinier, A, Bertrand, N, Mossiat, C, Prigent-Tessier, A, Beley, A, Marie, C, et al. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PloS one* 4, e8101. (2009).
  98. Bellenchi, GC, Volpicelli, F, Piscopo, V, Perrone-Capano, C, and di Porzio, U. Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? *Journal of neurochemistry* 124, 159-167. (2013).
  99. Li, WL, Yu, SP, Ogle, ME, Ding, XS, and Wei, L. Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Developmental neurobiology* 68, 1474-1486. (2008).
  100. Lindholm, P, Voutilainen, MH, Lauren, J, Peranen, J, Leppanen, VM, Andressoo, JO, et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448, 73-77. (2007).

101. Miyake, K, Yamamoto, W, Tadokoro, M, Takagi, N, Sasakawa, K, Nitta, A, et al. Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia. *Brain research* 935, 24-31. (2002).
102. Schauwecker, PE. Susceptibility to excitotoxic and metabolic striatal neurodegeneration in the mouse is genotype dependent. *Brain research* 1040, 112-120. (2005).
103. Apostolou, A, Shen, Y, Liang, Y, Luo, J, and Fang, S. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Experimental cell research* 314, 2454-2467. (2008).
104. Pellinen, T, Arjonen, A, Vuoriluoto, K, Kallio, K, Fransén, JA, and Ivaska, J. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *The Journal of cell biology* 173, 767-780. (2006).
105. Wajant, H, Pfizenmaier, K, and Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* 10, 45-65. (2003).
106. Crowe, MJ, Doetschman, T, and Greenhalgh, DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF- $\beta$  1 knockout mice. *The Journal of investigative dermatology* 115, 3-11. (2000).
107. Hayashi, T, Abe, K, and Itoyama, Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18, 887-895. (1998).
108. Zhao, BQ, Wang, S, Kim, HY, Storrie, H, Rosen, BR, Mooney, DJ, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nature medicine* 12, 441-445. (2006).
109. Müller, MB, Toschi, N, Kresse, AE, Post, A, and Keck, ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 23, 205-215. (2000).
110. Rivard, A, Silver, M, Chen, D, Kearney, M, Magner, M, Annex, B, et al. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *The American journal of pathology* 154, 355-363. (1999).
111. Yasuhara, T, Shingo, T, Muraoka, K, Kameda, M, Agari, T, Wen Ji, Y, et al. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain research* 1053, 10-18. (2005).

## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.

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

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü         |
|-----------------|----------|------|--------------------------|
| 13/01/2016      | 02       |      | Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ |

“Repetatif transkraniyal manyetik stimülasyonun (rTMS) beyin felci sonrası hasara etkisi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay**

| GÖREVİ | ADI SOYADI                        | İMZA |
|--------|-----------------------------------|------|
| Başkan | Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK             |      |
| Üye    | Prof. Dr. Ülkan KILIÇ             |      |
| Üye    | Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK          |      |
| Üye    | Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU |      |
| Üye    | Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY    |      |
| Üye    | Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL |      |
| Üye    | Taha KELEŞTEMUR                   |      |
| Üye    | Özge Şeyda DURGUT                 |      |
| Üye    | Fahriye ŞENBAHÇE                  |      |

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|            |                                                                      |              |             |
|------------|----------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| Adı        | ZEYNEP                                                               | Soyadı       | BALÇIKANLI  |
| Doğum Yeri | MALATYA                                                              | Doğum Tarihi | 27.09.1993  |
| Uyruğu     | Türkiye Cumhuriyeti                                                  | TC Kimlik No |             |
| E-mail     | <a href="mailto:zbalcikanli@hotmail.com">zbalcikanli@hotmail.com</a> | Tel          | 05466115444 |

### Eğitim Düzeyi

|                  |                               |                |
|------------------|-------------------------------|----------------|
|                  | Mezun olduğu Kurumun Adı      | Mezuniyet Yılı |
| Doktora/Uzmanlık |                               | -              |
| Yüksek Lisans    | İstanbul Medipol Üniversitesi | -              |
| Lisans           | İstanbul bilgi üniversitesi   | 2016           |
| Lise             | Özel Turgut özal anadolu      | 2011           |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    |        |       |                  |
|----|--------|-------|------------------|
|    | Görevi | Kurum | Süre (Yıl – Yıl) |
| 1. |        |       |                  |
| 2. |        |       |                  |
| 3. |        |       |                  |

|                 |                  |         |       |
|-----------------|------------------|---------|-------|
| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama | Konuşma | Yazma |
| İngilizce       | İyi              | İyi     | İyi   |
|                 |                  |         |       |

| Yabancı Dil Sınavı Notu |        |       |              |              |              |     |     |     |
|-------------------------|--------|-------|--------------|--------------|--------------|-----|-----|-----|
| KPDS                    | YÖKDİL | IELTS | TOEFL<br>IBT | TOEFL<br>PBT | TOEFL<br>CBT | FCE | CAE | CPE |
|                         | 60     |       |              |              |              |     |     |     |

|               |         |              |       |
|---------------|---------|--------------|-------|
|               | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
| ALES Puanı    | 73.5    |              |       |
| (Diğer) Puanı |         |              |       |

### Bilgisayar Bilgisi

|                                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|
| Program                           | Kullanım becerisi |
| Microsoft Word, Excel, Powerpoint | İyi               |
|                                   |                   |
|                                   |                   |

