

**CDNF ve MANF Nörotrofik Faktörlerinin İskemi Sonrası
Beyin Plastisitesi ve Onarımı Üzerine Olan Etkileri**

Program Kodu: 1001

Proje No: 114S402

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Araştırmacı:

Prof. Dr. Ülkan KILIÇ

Bursiyer(ler):

Elif SERTEL

Zeynep BALÇIKANLI

Emre TANCAN

Reyda KARAÇAY

EYLÜL 2017
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Son dönemde tespit edilmiş ve aynı zamanda yapısal olarak birbirlerine benzerlikleri ile bilinen iki nörotrofik faktör olan CDNF (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor) ve MANF'nin (Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor) literatürde daha önceden tanımlanmış olan nörotrofik faktörlerden farklı, benzersiz bir protein yapısına sahiptirler (Lindholm vd., 2007). 18 kDa'luk bu iki proteinin amino asit dizilimi GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) veya BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) gibi nörotrofik faktörlerden farklılık göstermektedir. Bu farklılık, MANF ve CDNF'nin diğer nörotrofik faktörlerden farklı sinyal yolları kullanmalarına ve bu nedenle daha önceden bilinen nörotrofik faktörlerden farklı etkilere sahip olmalarına yol açabileceği hipotezlerini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu yeni mekanizmaların bulunması, başta beyin felci olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabilecek potansiyele sahiptir.

Bu çalışmada MANF ve CDNF nörotrofik faktörlerinin restoratif (onarıcı) etkileri hasar sonrası in vivo şartlarda nöronal hayatta kalım, aracılık eden sinyal iletim yolları, doku modellemesi, angiogenez, nörogenez ve piramidal trakt plastisitesi üzerine olan etkileri araştırılmış ve aynı zamanda fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkileri ile de karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaların çalışılması amacıyla insanlarda %80 oranında inme vakalarından sorumlu olan orta serebral arter tıkanması fare modeli kullanılmıştır. Bu sayede elde ettiğimiz bulguların bu yeni bulunan aynı zamanda modelin klinik inme vakalarına benzerliğinden dolayı da, beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

“CDNF ve MANF Nörotrofik Faktörlerinin İskemi Sonrası Beyin Plastisitesi ve Onarımı Üzerine Olan Etkileri” başlıklı 114S402 proje numaralı bu proje 1001 ARDEB programı ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. CDF ve MANF	2
2.2. Beyin Felci ve Kısa Patofizyolojisi	3
2.3. Beyin Felcinde ER Stresi	5
2.4. Beyin Felci ve Plastisite:	5
2.5. Beyin Felci Tedavisinde Nörotrofik Faktörler	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. Deney dizaynı ve deneysel gruplar	8
3.2. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO) ve ozmotik pompa yerleştirme	9
3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Beyinden Örnek Alınması	9
3.4. İmmünohistokimya	9
3.5. Hücre İçi Sinyal Yolakları İle İlgili Proteinlerin Seviyelerinin Western Blot Yöntemiyle Belirlenmesi.....	12
3.6. qPCR yöntemi ile gen miktarındaki değışiklerin belirlenmesi	13
3.7. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili testler.....	17
3.8. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın belirlenmesi	18
3.9. İstatistik	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Serebral kan akımının ölçülmesi	19

4.2. Apoptotik hücre sayısının değerlendirilmesi	20
4.3. İskemi sonrası uzun dönemde atrofinin belirlenmesi	21
4.4. Nörogenez belirlenmesi	22
4.5. Gliogenezin belirlenmesi	23
4.6. Anjiyogenezin belirlenmesi	24
4.7. Nöronal progenitör hücrelerin belirlenmesi	25
4.8. Glial yaranın belirlenmesi	26
4.9. İskemi sonrası protein seviyesindeki değişiklikler	27
4.10 İskemi sonrası gen ekspresyon değişiklikleri	51
4.11. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili davranış testleri	68
4.12. Aksonal uzamanın değerlendirilmesi	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
6. KAYNAKLAR.....	88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.1 Deney dizaynı	8
Şekil 4.1.1 Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı	19
Şekil 4.2.1 Zamana bağlı olarak apoptozun değerlendirilmesi.....	20
Şekil 4.3.1 Korpus kallozumdaki (A) ve striatumdaki (B) post-iskemik atrofinin <i>cresyl violet</i> boyaması yapılarak değerlendirilmesi	21
Şekil 4.4.1 Nörogenezin değerlendirilmesi	22
Şekil 4.5.1 Gliogenezin değerlendirilmesi	23
Şekil 4.6.1 Anjiyogenezin değerlendirilmesi	24
Şekil 4.7.1 Nöronal progenitör hücrelerin değerlendirilmesi	25
Şekil 4.8.1 Glial yaranın değerlendirilmesi	26
Şekil 4.9.1.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-Akt anlatımına etkisi	27
Şekil 4.9.2.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p44/-42 anlatımına etkisi.....	29
Şekil 4.9.3.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p38 anlatımına etkisi.....	31
Şekil 4.9.4.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-JNK anlatımına etkisi.....	33
Şekil 4.9.5.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak p21 anlatımına etkisi	35
Şekil 4.9.6.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak eNOS anlatımına etkisi.....	37
Şekil 4.9.7.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak iNOS anlatımına etkisi.....	39
Şekil 4.9.8.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak nNOS anlatımına etkisi.....	41
Şekil 4.9.9.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Versican anlatımına etkisi.....	43
Şekil 4.9.10.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Brevican anlatımına etkisi.....	45
Şekil 4.9.11.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B1 anlatımına etkisi.....	47
Şekil 4.9.12.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B2 anlatımına etkisi.....	49

Şekil 4.11.2.1. İskemi sonrası el çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi	68
Şekil 4.11.3.1. İskemi sonrası motor koordinasyonun değerlendirilmesi.....	69
Şekil 4.11.4.1. İskemi sonrası anksiyetenin değerlendirilmesi	70
Şekil 4.11.5.1. İskemi sonrası hareketlilik süresinin değerlendirilmesi.....	71
Şekil 4.11.5.2. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; kenar bölgesi	72
Şekil 4.11.5.3. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; geçiş bölgesi	73
Şekil 4.11.5.4. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; merkez bölge.....	74
Şekil 4.12.1. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın değerlendirilmesi	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.6.2.1 cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları.....	14
Tablo 3.6.3.1 Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri	15
Tablo 4.10.1.1 İpsilateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi.....	51
Tablo 4.10.1.2 Kontralateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi.....	51
Tablo 4.10.2.1 İpsilateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi.....	52
Tablo 4.10.2.2 Kontralateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi.....	52
Tablo 4.10.3.1 İpsilateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi.....	53
Tablo 4.10.3.2 Kontralateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi.....	53
Tablo 4.10.4.1 İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi.....	54
Tablo 4.10.4.2 Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi.....	54
Tablo 4.10.5.1 İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi.....	55
Tablo 4.10.5.2 Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi.....	55
Tablo 4.10.6.1 İpsilateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi.....	56
Tablo 4.10.6.2 Kontralateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi.....	56
Tablo 4.10.7.1 İpsilateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi.....	57
Tablo 4.10.7.2 Kontralateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi.....	57
Tablo 4.10.8.1 İpsilateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi.....	58
Tablo 4.10.8.2 Kontralateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi.....	58
Tablo 4.10.9.1 İpsilateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki	

analizi	59
Tablo 4.10.9.2 Kontralateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi	59
Tablo 4.10.10.1 İpsilateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi	60
Tablo 4.10.10.2 Kontralateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi	60
Tablo 4.10.11.1 İpsilateral striatum ve kortekste MANF'nin gen seviyesindeki analizi	61
Tablo 4.10.11.2 Kontralateral striatum ve kortekste MANF'nin gen seviyesindeki analizi	61
Tablo 4.10.12.1 İpsilateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi	62
Tablo 4.10.12.2 Kontralateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi	62
Tablo 4.10.13.1 İpsilateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi	63
Tablo 4.10.13.2 Kontralateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi	63
Tablo 4.10.14.1 İpsilateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi	64
Tablo 4.10.14.2 Kontralateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi	64
Tablo 4.10.15.1 İpsilateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi	65
Tablo 4.10.15.2 Kontralateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi	65
Tablo 4.10.16.1 İpsilateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi	66
Tablo 4.10.16.2 Kontralateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi	66
Tablo 4.10.17.1 İpsilateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi	67
Tablo 4.10.17.2 Kontralateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi	67

ÖZET

Küçük protein yapıları ile nörotrofik faktörler, nöronların gelişimi sırasındaki rolleri yanında beyinde nöronların hayatta kalımları, nörogenez ve sinaptik bağlantıların korunmalarında mutlak rol oynamaktadırlar. Nörotrofik faktörlerin ifadelerindeki azalma veya yokluğun birçok nörodejeneratif hastalığın patobiyolojisinde rol oynamaktadırlar. CDNF (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor) ve MANF'nin (Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor) literatürde daha önceden tanımlanmış olan nörotrofik faktörlerden farklı, benzersiz bir protein yapısına sahiptirler (Lindholm vd., 2007). 18 kDa'luk bu iki proteinin amino asit dizilimi GDNF veya BDNF gibi nörotrofik faktörlerden farklılık göstermektedir. Bu farklılık, MANF ve CDNF'nin diğer nörotrofik faktörlerden farklı sinyal yolları kullanmalarına ve bu nedenle daha önceden bilinen nörotrofik faktörlerden farklı etkilere sahip olmalarına yol açabileceği hipotezlerini düşündürmektedir. Bu çalışmada MANF ve CDNF nörotrofik faktörlerinin restoratif (onarıcı) etkileri hasar sonrası in vivo şartlarda nöronal hayatta kalım, aracılık eden sinyal iletim yolları, doku modellemesi, angiogenez, nörogenez ve piramidal trakt plastisitesi üzerine olan etkileri araştırılacak ve aynı zamanda fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkileri ile de karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu mekanizmaların çalışılması amacıyla insanlarda %80 oranında inme vakalarından sorumlu olan orta serebral arter tıkanması fare modeli kullanılacaktır. Bu sayede elde edeceğimiz bulguların bu yeni bulunan aynı zamanda modelin klinik inme vakalarına benzerliğinden dolayı da, beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Beyin felcinden 72 saat sonra CDNF veya MANF uygulayarak bu faktörlerin nörorestoratif etkileri 30 günlük tedavi sonunda, farklı zaman aralıklarında kurban edilen hayvanlardan alınan örneklerden bu moleküllerin etkilerine aracılık ettiği düşünülen Akt, ERK, p38 ve JNK gibi sinyal yollarının aktiviteleri, aksonal onarımı/büyümeyi etkileyen moleküller protein ve gen ekspresyonu düzeyinde incelenecektir. Buna ilaveten, MANF ve CDNF'nin hasar sonrası beyin plastisitesi çerçevesinde piramidal trakt plastisitesi, doku modellemesi ve fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkileri de araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: CDNF, MANF, iskemi, plastisite

ABSTRACT

Neurotrophic factors are small proteins that play essential roles in development of neurons and the maintenance of neuronal synaptic function. Decrease or absence of neurotrophic factor levels play important roles in pathobiology of several neurodegenerative disorders. CDNF (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor) and MANF (Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor) have unique protein (Lindholm *et al.*, 2007). Amino acid sequences of these two 18 kDa-proteins are different than the other neurotrophic factors, such as GDNF or BDNF. This difference is considered to be the reason for MANF and CDNF to use distinct signaling pathways than other neurotrophic factors. To this end, elucidating the new mechanisms has the potential to offer new approaches in the treatment of neurodegenerative disorders including brain ischemia. In this project, restorative effects of MANF and CDNF on *in vivo* neuronal survival following an insult, mediating signaling pathways, tissue modelling, angiogenesis, neurogenesis and pyramidal tract plasticity were investigated and also compared with their effects on functional recovery. In order to study these mechanisms, Middle Cerebral Artery Occlusion, which is responsible for approximately 80% of all stroke cases in humans was used. With the use of this method and due to its similarity of this method with clinical stroke cases, we expect this project to contribute to the identification of novel target molecules in several neurodegenerative disorders including stroke. By administering CDNF or MANF 72-hours after brain ischemia, at the end of the 30-day treatment period, neurorestorative effects of such factors will be investigated in samples from animals sacrificed at different time intervals and activities of signaling pathways such as Akt, ERK, p38 or JNK will be investigated in both protein and gene levels. Additionally, effects of MANF and CDNF on pyramidal tract plasticity, tissue modelling and functional repair in the concept of brain plasticity following an ischemic insult were investigated.

Keywords: CDNF, MANF, ischemia, plasticity

1. GİRİŞ

Beyin felci, Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Bununla birlikte, motor ve psikolojik fonksiyon bozukluklarına neden olarak, hastaların uzun süre bakıma ihtiyaç duymasına yol açmaktadır (Donnan vd., 2008). Hasta bakımının ekonomik maliyeti, direkt ve dolaylı masrafları göz önünde bulundurulduğunda, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yıllık 50 milyar doları bulmaktadır (Mauldin vd., 2008). Buna karşın klinikte kullanılan tek tedavi yöntemi doku plazminojen aktivatörü uygulamasıdır. Bu uygulama ile tıkanan damarın doku plazminojen aktivatörü yardımıyla açılması hedeflenmektedir. Ancak ilk 4,5 saat içerisinde uygulanması gereken bu tedaviden akut beyin felci hastalarının yalnızca beşte biri yararlanabilmektedir (Adeoye vd., 2012). Bunun yanı sıra doku plazminojen aktivatörü tedavisi alabilen hastaların önemli bir kısmı, hasarın ciddiyetine bağlı olarak hayatları boyunca fonksiyonel ve psikolojik bozukluklar yaşamaktadır. Bu bağlamda, şu anki tedaviye alternatif, daha esnek ve geniş uygulama aralığına sahip klinik olarak uygulanabilir tedavilerin bulunmasına yönelik ihtiyaç önemini korumaktadır.

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

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. CDNF ve MANF

MANF (Mezensefalik Astrosit-türevli Nörotrofik Faktör) ve CDNF (Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör) yeni tanımlanmış, evrimsel olarak korunmuş bir protein ailesini oluşturmaktadır (Lindholm vd., 2007; Petrova vd., 2003). 2009'da yapılan çalışmalarda bu iki proteinin nörotrofik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Airavaara vd., 2009; Palgi vd., 2009; Voutilainen vd., 2009). MANF, ilk olarak sıçan Tip-1 astrosit ventral mezensefalik hücre hattı 1'in (VMCL1) kültür ortamından, kültürlenmiş embriyonik dopaminerjik sinirlerin sağ kalımlarını artırması özelliği sayesinde tanımlanmıştır (Petrova ve ark., 2003). Kültür ortamından izole edilen 179 amino asitlik öncü proteinin (preMANF) ilk 21 amino asitlik kısmının sinyal dizisi olduğu, olgun (mature) MANF'nin 158 amino asit içeren bir protein olduğu bulunmuştur (Petrova vd., 2003). MANF ve CDNF'yi kodlayan genler evrim süresince oldukça korunmuştur. İnsan CDNF ve MANF proteinleri yaklaşık %60 amino asit benzerliği göstermektedir. Benzer şekilde, preCDNF de 187 amino asit ve olgun CDNF 161 amino asit uzunluğundadır. Bu iki genin en önemli karakteristik özelliği, omurgasızlardan omurgalı canlılara kadar korunmuş olan sekiz Sistein rezidüsüdür. Proteinleri nötr pH 7 düzeyinde yüksek oranda suda çözünür ve monomerik yapıdadır. Bu proteinler salgılanmalarına karşın, kısmen endoplazmik retikulum (ER) içerisinde tutulmaktadırlar. MANF ve CDNF proteinlerinin iki önemli bölge içerdiği bulunmuştur. Bunlardan N-terminali lipidlerle veya membranlarla ilişkilendirilirken, C-terminal dizilerinde kısmi ER retansiyon sinyali bulunmuştur (Apostolou vd., 2008). Yapılan çalışmalarda MANF'nin C-terminalindeki iki Sistein rezidüsünün (127CKGC130) oluşturduğu disülfid köprü sayesinde ER içindeki protein katlanmasına yardımcı olarak hücrelerde ER stresini azaltmada rol aldığı gösterilmiştir (Lindholm vd., 2007). Ayrıca, ER stresi durumunda Manf ekspresyonunda artış mikrodizi analizleriyle gösterilmiştir (Lee vd., 2003; Mizobuchi vd., 2007). CDNF'nin ER stres ile ilgisi, astrositlerde viral vektör yardımıyla CDNF'nin over-eksprese edilmesi yoluyla çalışılmıştır. Bu çalışmada CDNF'nin tunikamisin kaynaklı ER stresi azaltmaya ve ER stresten kaynaklanan hücre hasarını azaltmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir (Cheng vd., 2013). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, MANF ve CDNF over-ekspresyonunun Merkezi Sinir Sistemi hasarı (örn. iskemi) durumunda ER stresine direnç göstererek hücre hasarını azaltmada rol oynayabileceği düşünülebilir.

Öte yandan, sıçanlarda status epilepticus veya global iskemi sonrası MANF mRNA düzeylerinde artış rapor edilmiştir (Lindholm vd., 2008). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada CDNF'nin en az GDNF kadar etkili bir şekilde dopaminerjik sinirlerin fonksiyonunu geri

kazanmasını sağladığı gösterilmiştir (Lindholm vd., 2007). Aynı model üzerinde MANF'nin nöroprotektif etkisi gösterilmesine karşın, nörorestoratif etkisi olduğu bulunmamıştır (Lindholm vd., 2007). 2010 yılında sıçanlarda beyin felci modeli uygulanan bir çalışmada, viral yolla uygulanan insan rekombinant MANF'nin enfarktüs hacmini azalttığı bulunmuştur (Airavaara vd., 2010), ancak bu çalışmada MANF'nin etkileri uygulama başlangıcından 2 hafta sonra incelenmiş, uzun süreli etkilerine yönelik bir araştırma yapılmamış ve MANF ile elde edilen pozitif bulgular CDNF ile kıyaslanmamıştır.

Özetleyecek olursak, 18 kDa'lık bu iki proteinin amino asit dizilimi GDNF veya BDNF gibi nörotrofik faktörlerden farklıdır. Bu farklılık, MANF ve CDNF'nin diğer nörotrofik faktörlerden farklı sinyal yolları kullanmasına ve önceden bilinen nörotrofik faktörlerden farklı etkilere sahip olmasına yol açmış olabilir. Bu nedenle, bu yeni mekanizmaların bulunması, başta beyin felci olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabilir. Bu amaçla gerçekleştirmeyi planladığımız çalışmamızda, beyin felci oluşturulduktan 72 saat sonra başlamak kaydıyla ozmotik pompa kullanarak 30 gün boyunca farelere CDNF, MANF veya araç (PBS) uygulaması yapılmıştır. Beyin felci oluşturulduktan 3, 14, 28, ve 55 gün sonra kurban edilen hayvanlarda bu proteinlerin iskemik hasarın azaltılmasına yönelik etkilerini ve olası moleküler mekanizmalarını araştırılmıştır.

2.2. Beyin Felci ve Kısa Patofizyolojisi

Beyin felci, Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Ayrıca, motor ve psikolojik fonksiyon bozukluklarına neden olarak hastaların uzun süre bakım almasını gerektirir (Donnan vd., 2008). Hasta bakımının ekonomik maliyeti, direkt ve dolaylı masrafları göz önünde bulundurulduğunda, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'ne (ABD) yıllık 50 milyar doları bulmaktadır (Mauldin vd., 2008). Buna karşın tek klinik tedavisi, doku plazminojen aktivatörüdür ve tıkanan damarın dokunun açılmasını hedeflemektedir. Ancak ilk 4,5 saat içerisinde uygulanması gereken bu tedaviden akut beyin felci hastalarının yalnızca beşte biri yararlanabilmektedir (Adeoye vd., 2012). Bununla birlikte doku plazminojen aktivatörü tedavisi alabilen hastaların önemli bir kısmı, hasarın ciddiyetine bağlı olarak hayatları boyunca fonksiyonel ve psikolojik bozukluklar yaşamaktadır. Bu bağlamda, alternatif, daha esnek ve uzun uygulama aralığına sahip ve klinik olarak yararlı tedavilerin bulunmasına yönelik ihtiyaç önemini korumaktadır.

Beyin felci, serebral kan akışının kritik bir noktaya kadar azalmasıyla bütün beyni veya belli bir bölgesini kapsayacak şekilde hasarlanması olarak tanımlanmaktadır. Lokal beyin felcinde, "kor" adı verilen hasarlı alanın merkez bölgesinde baskın olarak nekrotik

hücre ölümleri gözlenirken, “penumbra” adı verilen hasarlı alanın perifer bölgesinde baskın olarak apoptotik hücre ölümleri gözlenmektedir (Dirnagl vd., 1999). Bu iki bölgede hücre hasarı ve ölüm süreçleri birbirinden farklı gelişmektedir. Serebral kan akımı en fazla kor bölgede azalmakta, kan akımında azalma ise periferde doğru kademeli olarak düşmektedir. Kan akımı, kor bölgede normalin %15’in altına düşmektedir. Bu azalma Adenozin Trifosfat (ATP) düzeylerini normalin yaklaşık %25’ine düşürmektedir. Penumbra beyin hasarının ardından kan akımı normalin %15-40 aralığına ve ATP düzeyleri normalin %50-70 aralığına düşmektedir. Kor bölgesindeki bütün sinir hücreleri nekroza uğramaktadır. Beyin felci süresi uzadıkça penumbradaki sinir hücrelerinde de ölümler gözlenmektedir (Dirnagl vd., 1999).

Beyin felci sonrası nekrotik hücre ölümü, hücresel yapının kaybedilmesiyle karakterize edilen, protein sentezinden bağımsız bir süreçtir. Apoptotik hücre ölümü ise, DNA fragmentasyonu takiben hücresel yapının başta kaspaz proteinleri olmak üzere çeşitli enzimler yoluyla yıkılması sürecidir. Vasküler oklüzyondan hemen sonra beyin dokusunda glikoz ve oksijen eksilmekte, metabolizma sürecinin asidik yan ürünleri birikmeye başlamaktadır. Bunun sonucunda, mitokondride elektron transport zincirinin aktivitesi azalmaktadır. Bununla birlikte ATP konsantrasyonu hızla azalmaktadır. Sinir hücrelerinde üretilen ATP’nin yaklaşık %30’u, hücre membranı potansiyelinden sorumlu sodyum potasyum pompası tarafından kullanılmaktadır. Dolayısıyla, ATP düzeyinde azalma hücre içi sodyum konsantrasyonunu düzenleyen Na^+/K^+ pompasının çalışmasını bozmaktadır. Hücre membranında sürekli depolarizasyon hücre içine Ca^{++} girmesine yol açmaktadır. Ayrıca, yükselen hücre içi Na^+ düzeyleri, sinir hücrelerinde aksiyon potansiyelinin ardından hücre içinden Ca^{++} iyonlarını dışarı taşımaktan sorumlu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ değiştiricisinin aktivitesini azaltmakta ve hücre içinde daha fazla Ca^{++} iyonu birikmesine neden olmaktadır. Membran potansiyeli elektriksel deşarj eşiğine ulaştığında, kor bölgesindeki sinir hücreleri iskemik deşarjlar yoluyla tekrar tekrar ateşlenerek transmitterlerini ortama bırakmaktadır. Sinir hücrenin enerji ihtiyacı bu iskemik depolarizasyonlar nedeniyle daha da artmaktadır. Hücre içindeki yüksek Ca^{++} düzeyleri, hücre içi ve dışı yapısal bütünlüğün sağlanmasında görev alan kalpain proteaz ile hücresel membranların yıkımında görev alan fosfolipaz enzimlerini aktif hale getirmektedir (Hossmann, 1993).

Yükselen Ca^{++} düzeylerinin bir başka etkisi mitokondri üzerindedir. Hücre içindeki yüksek Ca^{++} miktarı mitokondride hasara yol açmaktadır, bu da sonuç olarak enerji miktarındaki azalmayı kötüleştirmektedir. Hasar gören mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom C’nin hücrede apoptoz yolağını başlattığı düşünülmektedir (Dirnagl vd., 1999). Öte yandan, hücre membranında depolarizasyon glutamatın sinaptik boşluğa ve ekstraselüler

ortama bırakılmasına yol açmaktadır. Artan enerji eksikliği nedeniyle hücrelerarası ortamdan geri alınamayan glutamat, glutamat nörotoksitesine yol açmaktadır (Martin vd., 1994).

2.3. Beyin Felcinde ER Stresi

Beyin felcinin kompleks patofizyolojik mekanizmaları oksijen-glikoz deprivasyonu, aşırı glutamat salımı ve buna bağlı egzitotoksiste, reaktif oksijen türlerinin oluşması, protein ve lipid modifikasyonları, kalsiyum iyonu regülasyonunda bozulma, mitokondri fonksiyonunda bozulma, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve nihayetinde apoptozu içermektedir (Murphy vd., 2009). Bu olayların sonucunda, iskemik hasar bölgesinde sinir hücreleri ölümü nedeniyle sinirsel ağların bozulmakta, bunun sonucunda çeşitli davranışsal ve/veya bilişsel fonksiyonlar etkilenmektedir. Ancak, hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular, iskemik beyin hasarı sonrasında beynin kendi içinde sinirlerin yeniden sinaptik bağlantılar yaparak kendi kendini tamir etmeye çalıştığına işaret etmektedir (Murphy ve Corbett, 2009).

Beyin iskemisinin ardından sinir hücrelerinde protein sentezi inhibisyonu (PSI) olduğu bilinmektedir (Hossmann, 1993). Serebral kan akımında azalmanın, protein agregasyonuna, ER Ca^{++} miktarının azalmasına ve ER'de lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesine yol açarak, ER stresine neden olduğu bilinmektedir (DeGracia vd., 2002). Ayrıca, ER stresıyla ilişkili olduğu bulunan birçok genin ekspresyon düzeyinin beyin felci modellerinde de arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, beyin felci kaynaklı hücre ölümünde ER stresin rolüne yönelik kanıtlar transgenik hayvan modellerinde gösterilmiştir (Tajiri vd., 2004) ve bu nedenle, ER fonksiyonunun geri kazanımına yönelik çalışmaların, sinir hücrelerinin beyin felcinden kaynaklanan stres koşullarıyla daha iyi bir şekilde mücadele etmesine ve sonuç olarak sağ kalım oranında artış sağlaması amaçlanmaktadır.

2.4. Beyin Felci ve Plastisite:

İskemik beyin felci sonrası insanlarda motor fonksiyon bozuklukları yaygın olarak görülmektedir ve nörolojik iyileşme kısıtlıdır (Bonita vd., 1994). Bu dönemde beyin felcinde iyileşme kortikal ve subkortikal seviyede sinir ağlarının yeniden düzenlenmesiyle sağlanmaktadır. Hasarlı bölgenin beynin diğer bölgeleriyle iletişimini sağlamak amacıyla yedek ya da işlevsel olmayan sinir ağları aktif hale getirilmektedir. Beyin felci sonrası hasarlı bölgenin yeniden şekillendirilmesi aşamasında anjiyogenezin yanı sıra astrogliozun inhibisyonu ve anti-enflamatuvar etki de iyileşme sürecinde rol oynamaktadır (Bacigaluppi vd., 2009). Bunun yanı sıra, beyin felci sonrası iskemik olmayan kontralateral beyin hemisferinde artan miktarda damarlanma gibi yanıtlar gözlenmiştir. Bu hemisferde gözlenen değişikliklerin hasar iyileşme sürecine olumlu etkisi; kontralateral motor kortekse anterograd

traser enjeksiyonu kullanılarak, plastisite arttırıcı uygulamaların kontralateral projeksiyonlarda artışa yol açtığına yönelik bulgular yoluyla gösterilmiştir (Papadopoulos vd., 2002; Wiessner vd., 2003). Erişkin bireylerde Merkezi Sinir Sistemi'nde hasar gören bir akson yerine nöroanatomik plastisite yoluyla zarar görmemiş sinirlerden akson uzama kapasitesi oldukça sınırlıdır. Oysa gelişim sırasında beynin plastisite kabiliyeti olduğu bilinmektedir (Cao vd., 1994; Carr vd., 1993). İskemik beyin felci sonrasında beynin kendi içinde anjiyogenez, nörogenez ve sinaptogenez mekanizmalarını etkinleştirerek kendi kendini iyileştirmeye çalıştığı bilinmektedir (Arvidsson vd., 2002; Nakatomi vd., 2002). Bu mekanizmaların subakut fazda rehabilitasyon çalışmalarıyla arttırılabildiği bilinmesine karşın (Kilic vd., 2010; Kilic vd., 2008; Reitmeir vd., 2011; van der Lee vd., 1999; Winter vd., 2005; Wolf vd., 2002) şu anda beyin felci sonrası iyileşmeyi arttırmak üzere klinikte kullanılabilen herhangi bir tedavi bulunmamaktadır. Dolayısıyla erişkin bireylerde, özellikle beyin felcinden sonra beynin kendi plastisite kapasitesini arttırmak en akla yatkın stratejilerden biri olarak görülmektedir.

2.5. Beyin Felci Tedavisinde Nörotrofik Faktörler

Beyin gelişiminde sinir bağlantılarının düzgün bir şekilde kurulması hayati öneme sahiptir. Klasik nörotrofik faktör teorisine göre, (Levi-Montalcini, 1987) yalnızca yeterince trofik faktör desteği alan sinir hücreleri sağ kalmakta ve hedefleriyle sinaptik bağlantılar kurmaktadır; oysa yeterli derecede trofik faktör alamayan sinir hücreleri apoptotik hücre ölümü geçirmektedir. Nörotrofik faktörler aynı zamanda hücre göçü, farklılaşma ve ayrıca sinirlerin hasar sonrasında rejenerasyonunu desteklemektedir (Airaksinen vd., 2002). Merkezi sinir sisteminin gelişmesinde ve idame ettirilmesinde nörotrofik faktörlerinin rollerine yönelik bilinenler sınırlıdır. Örneğin, GDNF'nin Parkinson modellerinde nöroprotektif ve nörorestoratif olduğu gösterilmiştir, BDNF'nin de yetişkinlerde merkezi sinir sisteminde sinaptik plastisitede görev aldığı gösterilmiştir (Lu vd., 2005).

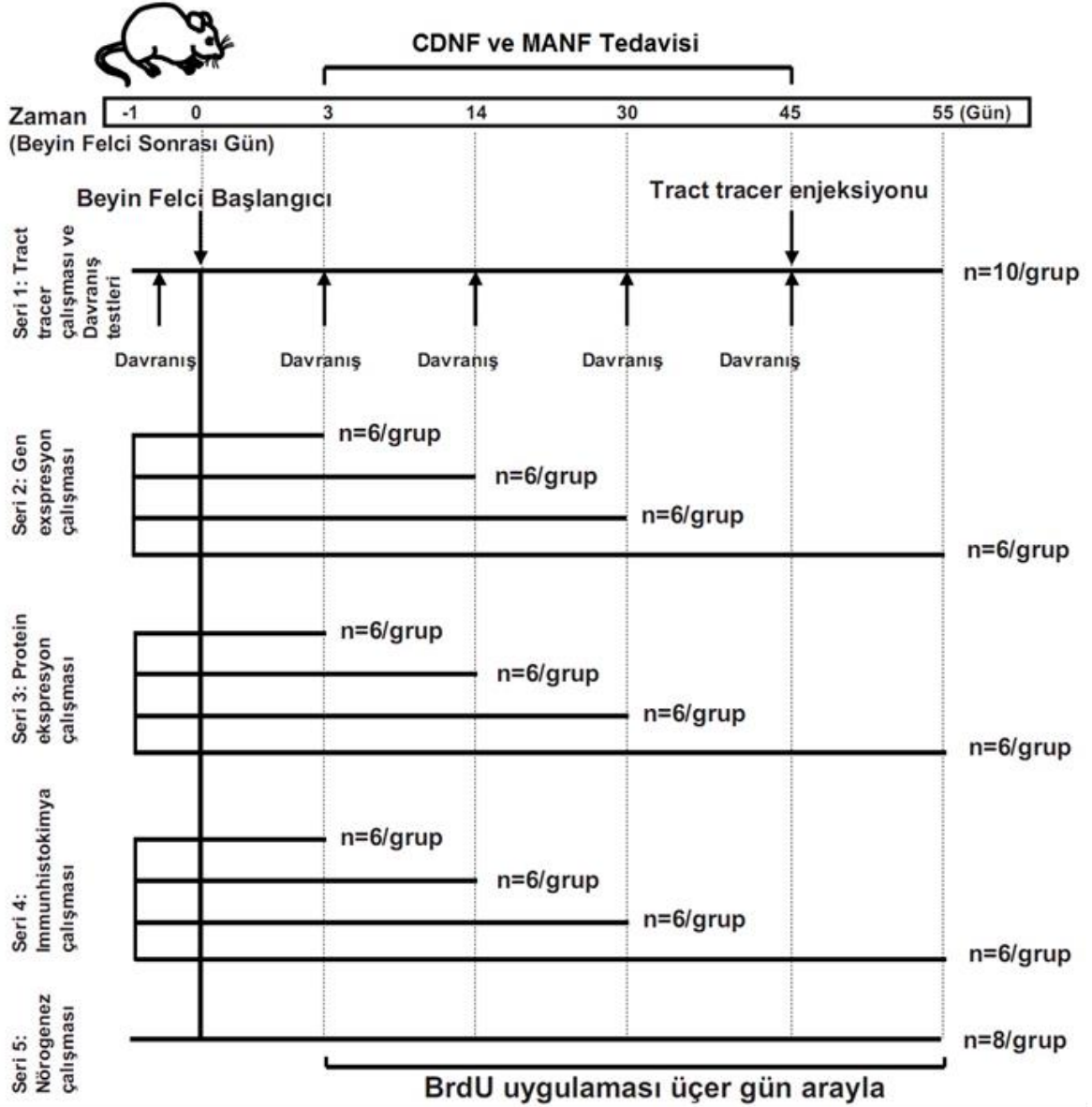
İskemik beyin hasarının tedavisinde üç temel terapötik yaklaşım yer almaktadır: sinir hasarıyla ilgili akut moleküler mekanizmaları en aza indirmek, hasardan sonra canlı kalan sinir ağlarının fonksiyonel olarak iyileştirilmesini sağlamak ve yeni fonksiyonel sinir bağlantılarını sağlayarak "sinirlerin yeni bağlantılar yapması" yoluyla davranışsal ve bilişsel aktivitelerde iyileşmeler sağlamak. Nörotrofik faktörlerin beyin hasarı sonrası hücre göçü, aksonal yol bulma, nörit uzaması ve sinaptogenez oluşumunda rol oynayarak beyin hasarının azaltılmasında kullanması düşünülmüştür. Bundan yola çıkarak, 2011'de Brain dergisinde yayınlanan çalışmamızda ve yine 2011 yılında Neurobiology of Disease dergisinde yayınladığımız bir çalışmamızda, mini-ozmotik pompa (Alzet®) kullanarak, beyin felcinden 72 saat sonra başlamak itibarıyla 30 gün boyunca sürekli olarak ve sabit hızda

hormon veya nörotrofik faktör (sırasıyla, eritropoietin ve VEGF) uygulaması yaptık (Herz vd., 2012; Reitmeir vd., 2011). Ancak, model hayvanlar üzerinde özellikle GDNF ile elde edilen başarılı sonuçların klinik tedavide başarısız olması araştırmacıların yeni nörotrofik faktörler üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Dizaynı ve Deneysel Gruplar

Hayvanlara yapılan bütün müdahaleler ve deneyler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (16/2014) alınarak yapılmıştır. Deneyler öncesinde ve sonrasında fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde kendilerine ayrılmış odalarda tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan 8-12 haftalık erkek C57BL6j suşu fareler rastgele olarak 1 µg/gün CDNF veya 1 µg/gün MANF veya taşıyıcı kontrol (PBS) grubuna ayrılmıştır. Davranış seti için grup başı 10, diğer setler için grup başı 6 hayvan kullanılmıştır.



Şekil 3.1.1. Deney dizaynı. Davranış seti için grup başı 10 hayvan kullanılmış olup, diğer setlerde grup başı 6 hayvan kullanılmıştır. Otuz dakika iskemi sonrası 72 saat beklenmiş, 72. saatin sonunda 1 µg/gün dozunda olacak şekilde CDNF, MANF veya taşıyıcı kontrol (PBS) tedavileri 28 gün boyunca ozmotik pompa yardımıyla verilmiştir.

3.2. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO) ve Ozmotik Pompa Yerleştirme

C57BL6j suşu fareler orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyon süresi boyunca %1'lik izofluran gaz anestezisi altında ve vücut sıcaklıkları 36,5-37,0 °C arasında tutulmuştur. Benzer şekilde oklüzyon ve reperfüzyon süresi boyunca beyin kan akımındaki değişimleri anlık olarak ölçebilmek için Laser Doppler flowmetre (Perimed, İsveç) cihazı kullanılmıştır. Cihazın fiberoptik probu, Bregma'nın -2 mm posterior ve 6 mm lateralı olacak şekilde hasarlı hemisferde direkt kafatası kemiği üzerine dental yapıştırıcı ile sabitlenmiştir. Orta serebral arter oklüzyonu modeli oluşturmak için monofilament tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte, boyun bölgesine yapılan kesi sonrası, karotid arterler izole edilmiş ve 6-0 ipek (S1165, Doğsan, Türkiye) ipe ligasyon yapılmıştır. Geçici olarak damarı tıkmak için mikrovasküler klips internal karotid üzerine yerleştirilmiş, kommon karotid artere damar makası ile kesik atılmış ve 7-0 kalınlığındaki monofilament (701934PK5Re, Doccol, ABD) kesikten internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itilmiştir. Orta serebral arterin doğru olarak tıklandığı Laser Doppler flowmetre (Perimed, Stockholm, Sweden) cihazı yardımı ile beyin kan akımındaki düşüşten kontrol edilmiştir. Oklüzyondan 30 dakika sonra ip geri çekilmiş, reperfüzyonun takip edilmesi amacıyla kan akımı 20 dakika daha takip edilmiştir. İskemi bitişinden 3 gün sonra fareler tekrar gaz anestezide alınmış ve içerisinde PBS, CDNF veya MANF (PBS içinde 1 µg/gün) bulunan ozmotik pompalara (Alzet 2004; Alzet) bağlı kanüller (Brain infusion kit 3, Alzet, ABD) farelerin sol lateral ventrikülüne yerleştirilmiştir. Fareler, ozmotik pompanın çıkarılacağı iskemi sonrası 28. güne kadar günlük olarak gözlemlenmiş ve herhangi bir serebral kanama veya enfeksiyon görülmemiştir. Fareler, iskemiden 42 gün sonra tekrar gaz anestezide alınmış, aksonal projeksiyon ile ilgili traserlerin uygulanması amacıyla ozmotik pompalar çıkarılmış ve farelerin motor kortekslerine enjeksiyon yapılmıştır (Kilic vd., 2014).

3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Beyinden Örnek Alınması

Konvensiyonel immunohistokimya metodu için her gruptan 6 fareye iskemiden 3, 14, 28 ve 55 gün sonra % 0,9 NaCl ile transkardiyak perfüzyon uygulanmıştır. Beyinler kuru buz üzerinde hızla dondurulmuş ve Bregma seviyesinden 18 µm'lik koronal kryostat kesitleri alınmıştır (Kilic vd., 2014).

3.4. İmmünohistokimya

Her bir boyama için tüm gruptaki her bir hayvandan alınan kesitler klasik immünohistokimya yöntemi ile boyanmıştır. Bunun için -80 °C'den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra % 4'lük paraformaldehit (PFA, 1040051000, Merck, ABD) solüsyonunda 7 dakika bekletilen kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde yıkandıktan sonra uygun serumlarla 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır.

Kesitler 1 saatin sonunda uygun primer antikorlarla gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün sabah, kesitler PBS çözeltisinde tekrar yıkandıktan sonra uygun sekonder antikorlar ilave edilmiş ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Benzer şekilde yıkanan kesitlere daha sonra hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için 4',6-diamidine-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI, D9542, Sigma Aldrich, ABD) boyaması yapılmıştır. Boyamaların ardından kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmış ve kesitler konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntülenen kesitlerin analiz için fotoğrafları çekilmiştir. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için, çekilen fotoğraflarda striatum bölgesinden 6 alan, hem ipsilateral hem de kontralateral bölgede benzer yerler olacak şekilde belirlenmiş ve boyama pozitif hücreler sayılarak her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Kilic vd., 2014).

3.4.1. *İn-sitü* Hücre Ölüm Kiti (TUNEL) ile DNA Kırıklarının Belirlenmesi

İmmünohistokimya çalışmaları için alınan kesitlerden DNA kırıklarının *in sitü* olarak tanınması ve zamana bağlı hücre ölümünün belirlenmesi için TUNEL kiti (11684795910, Roche, ABD) kullanılarak apoptotik hücre tayini yapılmıştır. Kısaca, -80 °C'den çıkarılan kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, sonrasında % 4'lük PFA solüsyonu içerisinde önce oda sıcaklığında 10 dakika daha sonra da +4 °C'de 10 dakika daha olmak üzere bekletilmiştir. Fiksasyon bitiminde kesitler PBS çözeltisinde yıkanmıştır. Membran geçirgenliğini sağlayabilmek için kesitler 2 dakika buz üzerinde Triton-X-100 (X100, Sigma Aldrich, ABD) deterjanı ve tri-sodyumsitrat di-hidrat (1.064.481.000, Merck, ABD) içeren solüsyonda daha sonra da 1 dakika boyunca 750 Watt mikrodalga içerisinde tri-sodyumsitrat di-hidrat pH 6,0 solüsyonda inkübe edilmiştir. Kesitler PBS çözeltisinde yıkanmıştır. Uygun bloklayıcı solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen kesitler, sonrasında enzim ve substrat içeren TUNEL karışımı içerisinde 70 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için iskemik striatumda 6 alan belirlenmiş, fotoğraflanmış ve TUNEL(+) hücreler sayılarak her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Beker vd., 2015).

3.4.2. Post-İskemik Atrofinin Belirlenmesi

Uzun dönemde striatum ve korpus kallozumdaki post-iskemik atrofinin belirlenmesi için 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvandan alınan kesitlere *Cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Kısaca -80 °C'den çıkarılan kesitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş, daha sonra % 4'lük PFA solüsyonunda 15 dakika inkübe edilmiştir. PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra 2 dakika masa üzerinde, sonrasındaki 13 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde *Cresyl violet* boyası ile muamele edilmiştir. Kesitler boyamadan hemen sonra her birinde beşer saniye inkübe edilecek şekilde sırasıyla % 70, % 90, % 95 ve %

100'lük etanol serisinden geçirilmiştir. Alkol serisinden sonra boyanın fikse olması için ksilen solüsyonuna alınan kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmıştır. Görüntüleme, ışık mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Alınan görüntülerde kontralateral striatum, ipsilateral striatum ve korpus kallozum alanları ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı ile ölçülmüş, kontralateralinden ipsilateralin çıkarılması ile birlikte hasar sonrası oluşan atrofi hesaplanmıştır (Kilic vd., 2014).

3.4.3. Hücre Farklılaşmasının BrdU ile Belirlenmesi

İskemi sonrası yeni oluşan ve farklılaşan hücreleri takip edebilmek için deney hayvanlarına, beyin felci hasarının oluşturulmasından üç gün sonra başlamak üzere, üçer gün aralıklarla intraperitoneal yolla 100 mg/kg dozunda 5-bromo-2'-deoksiüridine (BrdU, B5002, Sigma Aldrich, ABD) verilmiştir. Elli beş günün sonunda farelere yüksek doz anestezi altında serum fizyolojik ile perfüzyon ve % 4'lük PFA ile fiksasyon yapılmıştır. Farelerin beyinleri çıkarılmış, çıkarılan beyinler +4 °C'de 3 saat daha % 4'lük PFA çözeltisinde inkübe edilmiş, son olarak da % 30'luk süktroz çözeltisinde +4 °C'de çökene kadar bekletilmiştir. Çöken beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuş ve cryostat cihazı kullanılarak bregma seviyesinden 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Tüm gruplardaki her bir hayvan için kesitler immünohistokimya bölümünde (3.4. İmmünohistokimya) belirtilen şekilde boyanmıştır. BrdU'nun DNA'nın yapısına katılması sebebiyle boyamanın gerçekleştirilebilmesi için klasik immünohistokimya metodundan farklı olarak 2 N HCl kullanılmış ve DNA'nın parçalanması sağlanmıştır. GFAP/BrdU ve NeuN/BrdU boyamalarının yapılabilmesi için % 4'lük PFA ile fiksasyon aşamasından sonra kesitler 15 dakika kaynayan sodyum sitrat çözeltisi içerisinde kaynatılmış, daha sonra da 15 dakika boyunca oda sıcaklığındaki çözelti içerisinde soğumaya bırakılmıştır. Sitrat aşamasından sonra kesitler PBS çözeltisinde yıkanmış, daha sonra GFAP veya NeuN antikorları ile boyamaları ayrı ayrı yapılmıştır. Son olarak da BrdU boyaması aşamasına geçilmiştir. GFAP (3656, Cell Signaling Technologies, CST, ABD) veya NeuN (MAB377C3, Merck, ABD) primer antikorlarının inkübasyonu bittikten sonra kesitler PBS çözeltisinde yıkanmış, 37 °C'de 1 saat boyunca 2 N HCl solüsyonunda inkübe edilmiştir. Bölüm 3.4'te açıklandığı gibi, 1 saat oda sıcaklığında bloklama, 1 saat oda sıcaklığında BrdU primer antikor (ab6326, Abcam, ABD) ile inkübasyon ve uygun sekonder antikorla inkübasyon aşamalarından sonra hücre çekirdeğini görüntüleyebilmek için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için iskemik hemisferde 24 alan belirlenmiş, fotoğraflanmış ve GFAP/BrdU ve NeuN/BrdU immünoboyama pozitif hücreler sayılarak her bir grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Doepfner vd., 2017).

3.4.4. Boyanan Kesitlerin Görüntülenmesi Ve Değerlendirilmesi

Boyanan kesitlerin görüntülenmesi ve analizi için aksi belirtilmeyen tüm kesitlerde konfokal (LSM 780; Zeiss, Almanya) mikroskop kullanılmıştır. Program tarafından kontrol edilen motorize tabla sayesinde x-y-z düzlemlerinde otomatik hareket sağlanmış, görüntüleme aşamasında kesitte bulunan herhangi bir hücre çekirdeğini fokus farkı yüzünden kaçırmamak için z düzleminde farklı fokuslardan görüntüler alınmış ve alınan görüntülerin hepsi Zen Black programı kullanılarak *maximum intensity projection* (maksimum yoğunluk projeksiyonu) modunda birleştirilmiştir. Programın *tile* (görüntüleri yanyana birleştirme) ve *z-stack* (farklı fokuslardan görüntü alabilme) fonksiyonlarını kullanarak ipsilateral hemisferden görüntüler alınmıştır (Kilic vd., 2014).

3.4.5. Glial Yaranın Değerlendirilmesi

Glial yaranın değerlendirilebilmesi için daha önce GFAP/BrdU boyanan kesitlerin tüm hasarlı hemisferleri konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Daha sonra Zen Blue (version 2012; Carl Zeiss, Almanya) programı kullanılarak iskemik hemisferdeki glial yara alanı ölçülmüştür. Her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Kilic vd., 2014).

3.5. Hücre İçi Sinyal Yolakları İle İlgili Proteinlerin Seviyelerinin Western Blot Yöntemiyle Belirlenmesi

Protein ekspresyon çalışmaları için iskemiden 3, 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları izole edilmiştir. Dokular protein izolasyonuna kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5.1. Protein İzolasyonu

-80 °C'den çıkartılan dokulara lizis solüsyonu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 M EDTA, *protease inhibitor cocktail*; 20-201, Millipore, ABD) ilave edilmiş ve dokular homojenizatör (Silent Crusher S,; Heidolph, Almanya) yardımıyla homojenize edilmiştir. Örnekler 20 dakika buz üzerinde inkübasyonun ardından 14000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar (üst faz) pelletlerden ayrılarak alikotlanmıştır (Beker vd., 2015; Kilic vd., 2014).

3.5.2. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi

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

3.5.3. Western Blot

Örnekler Any kD™ Mini-PROTEAN jelin (456-9036, Bio-Rad, ABD) her bir kuyucuğuna 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklenerek 50 V'da 5 dakika, daha sonra 100 V'da bir saat ve en son 150 V'da bir saat daha yürütülmüştür. Ardından Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti kullanılarak (170-4272; Bio-Rad, ABD) jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanmış % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat bloklamanın ardından +4 °C'de gece boyu bloklama solüsyonunda seyreltilen primer antikor (p-AKT, p-p44/42, p-p38, p-SAPK/JNK, p21, eNOS, iNOS, nNOS, Versican, Brevican, Efrin B1 ve Efrin B2) ile inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanan membranlara bloklama solüsyonunda hazırlanan sekonder antikor ilave edilmiş ve membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bantların görüntülenmesi için deteksiyon solüsyonu (Clarity™ Western ECL Substrate, 1705060, Bio-Rad, ABD) eklenmiş ve membranlar, ChemiDoc MP (Biorad) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.5.4. Stripleme

Membranlar strip solüsyonu ile muamele edilerek 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanarak, bloklama aşamasından itibaren izlenen protokol farklı bir antikor (t-p44/-42, 9102, CST; t-p38, 9212, CST; t-SAPK/JNK, 9258, CST veya Beta-aktin, 4970, CST) kullanılarak tekrar edilmiştir. Örneğin; Fosfo-SAPK/JNK antikoruna muamele edildikten sonra stripleme yapıp aynı antikoru totaline (total-SAPK/JNK) bakılmıştır.

3.5.5. Değerlendirme ve istatistik

Tüm sonuçlar ImageJ programında analiz edilmiştir. Her bir proteinin optik yoğunluk değerinden arka plan (*background*) çıkartıldıktan sonra, değerler endojen kontrol olarak kullanılan beta-aktin proteinine göre optimize edilmiştir. Kontrol, CDNF veya MANF tedavi grupları arasındaki zamana bağlı değişimler tek-yönlü varyans analizi (*One-Way ANOVA*) ve akabinde Fisher LSD post-hoc testi kullanılarak SPSS programında belirlenmiştir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6. qPCR yöntemi ile gen miktarındaki değişiklerin belirlenmesi

Gen ekspresyon çalışmaları için, fareler iskemiden 3, 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Beyinlerden kuru buz üzerinde bregmadan 2 mm kaudal ve 2 mm rostral bloklar halinde kesitler alınmıştır. Bu bloklardan ipsilateral striatum ve kontralateral striatumlardan örneklerden aynı grupta olanlar birleştirilmiştir. Birleştirilen dokular RNA izolasyonuna kadar -80 °C de saklanmıştır. RNA izolasyonu için alınan ve -80 °C de saklanan beyin dokularından

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qPCR gen ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Anti-enflamatuvar etkili genler (IL1 β , TNF α , TGF β), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9), plastisiteyi uyarıcı ve hücre yaşamını etkileyen genler (GAP43, CNTF, BDNF, CDNF, MANF) ve plastisiteyi etkileyen genler (Ncam1, Ephrin A5, Ephrin B1, Versican, Ncan, Ntn1) olmak üzere toplam 17 gendeki değişiklikler incelenmiştir.

3.6.1. RNA izolasyonu

14, 28 ve 55. gün sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan beyin dokularından RNA izolasyonu Qiagen AllPrep RNA/DNA/Protein İzolasyon kiti kullanılarak (80004; Qiagen, ABD) yapılmıştır. Dokular, kit içinden çıkan protokole uygun olarak, 600 μ L RLT lizis tamponu içinde cam homojenizatör ile ezilerek ve ardından 21G uçlu şırıngadan geçirilerek homojenize edilmiştir. 18.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek üstte kalan faz alınmış ve kitten çıkan DNA spin kolonuna yüklenmiştir. Kolondan akan sıvı faza aynı hacimde % 70'lik etil alkol ilave edilmiştir. Süspansiyon, kit içinden çıkan RNeasy spin kolonuna yüklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon, kit ile hazır gelen RW1 yıkama çözeltisi ile 1 defa, ardından RPE yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır. Kuruması için temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınan kolon, boş olarak 18.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, kolonun altına yeni bir temiz mikrosantrifüj tüp yerleştirilmiş ve kolona 50 μ L RNase içermeyen su ilave edilerek 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA'lar -80 °C'de saklanmıştır (Doepfner vd., 2017; Reitmeir vd., 2011).

3.6.2. cDNA sentezi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu Implen P330 NanoPhotometer cihazı kullanılarak, OD₂₆₀ ölçümü üzerinden hesaplanmış ve tüm örneklerin saflığı (OD₂₆₀/OD₂₈₀ ve OD₂₆₀/OD₂₃₀) tayin edilmiştir. Hesaplanan değerlere göre, komplementer DNA (cDNA) sentezi için her bir örnekten 1 μ g RNA alınarak ve Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak (04896866001; Roche, ABD) cDNA sentezi yapılmıştır.

Tablo 3.6.2.1 cDNA sentezinde kullanılan solüsyon oranları

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

Kullanılan kit için önerilen protokole uygun olarak, 0,2 μ L'lik PCR tüplerinde 1 μ g RNA'ya karşılık gelen hacim, random primerler ve oligo(dT) primerler ile karıştırılmış ve bir termal döngü cihazında (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, ABD) 65 °C'de 10 dakika inkübe edilerek buz üzerine alınmıştır. Ardından, yukarıdaki tabloda belirtildiği gibi 24 reaksiyon için

ana karışım hazırlanmış ve reaksiyon başına 10,5 µl olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Böylece reaksiyon başına her bir tüpte total hacim 30 µl olmuştur. Reaksiyon, termal döngü cihazına tekrar alınmış, 50 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından enzimin inaktivasyonu için 80 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri, qPCR çalışmasında kullanılmak üzere 1:10 oranında RNA ve DNA içermeyen su ile seyreltilmiştir. Stok çözeltiler -80 °C'de saklanmıştır.

3.6.3. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve kullanılan primerler

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

Tablo 3.6.3.1. Gen çalışmalarında kullanılan primerler ve DNA dizileri

Gen adı	DNA dizisi
GAPDH	F: 5' – AGGTCGGTGTGAACGGATTTG – 3' R: 5' – TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA – 3'
β-aktin	F: 5' – GGCTGTATTCCCCTCCATCG – 3' R: 5' – CCAGTTGGTAACAATGCCATG – 3'
IL-1β	F: 5' – GCAACTGTTCTGAACTCAACT – 3' R: 5' – ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT – 3'
TNFα	F: 5' – CCCTCACACTCAGATCATCTTCT – 3' R: 5' – GCTACGACGTGGGCTACAG – 3'
TGFβ1	F: 5' – CTCCCGTGGCTTCTAGTGC – 3' R: 5' – GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG – 3'
VEGF-B	F: 5' – GCCAGACAGGGTTGCCATAC – 3' R: 5' – GGAGTGGGATGGATGATGTCAG – 3'
VEGF-A	F: 5' – ACCATGAACTTTCTGCTCTCTTG – 3' R: 5' – GAACTTGATCACTTCATGGGACT – 3'
MMP9	F: 5' – CTGGACAGCCAGACACTAAAG – 3' R: 5' – CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG – 3'
GAP43	F: 5' – TGGTGTCAAGCCGGAAGATAA – 3' R: 5' – GCTGGTGCATCACCTTCT – 3'
CNTF	F: 5' – TCTGTAGCCGCTCTATCTGG – 3' R: 5' – GGTACACCATCCACTGAGTCAA – 3'
BDNF	F: 5' – TCATACTTCGGTTGCATGAAGG – 3' R: 5' – AGACCTCTCGAACCTGCCC – 3'
CDNF	F: 5' – CTTTTGCGCCGGGTTTTGTAT – 3'

	R: 5' – AGGGAGTTGTAGAATCGGTCTAA– 3'
MANF	F: 5' – TCTGGGACGATTTTACCAGGA – 3' R: 5' – TCTTGCTTCACGGCAAACTTTA – 3'
Ncam1	F: 5' – ACCACCGTCACCACTAACTCT – 3' R: 5' – TGGGGCAATACTGGAGGTCA – 3'
Efrin A5	F: 5' – ACACCGTACATGAGTCAGCC – 3' R: 5' – ACGGGAGGAGACTGTGCTAT – 3'
Efrin B1	F: 5' – TGTGGCTATGGTCGTGCTG – 3' R: 5' – CCAAGCCCTTCCCACTTAGG – 3'
Versican	F: 5' – TTTTACCCGAGTTACCAGACTCA – 3' R: 5' – GGAGTAGTTGTTACATCCGTTGC – 3'
Nörocan	F: 5' – TGCAACCACGGCTAAGCTC – 3' R: 5' – GGGGATAAGCAGGCAATGAC – 3'
Netrin-1	F: 5' – TGTGTCAGCGGACTTCCTTC – 3' R: 5' – AGGAACACTGGCCCAAACAA – 3'

Tablo 3.6.2.1'de belirtilen oranda her bir cDNA örneği ve gen için ana karışım, cDNA olmaksızın hazırlanarak 96'lık real time PCR plakasına (*Hard Shell PCR Plate*, HSP9601, Bio-Rad, ABD) 9'ar ıl olarak dağıtılmıştır. Daha sonra uygun cDNA örnekleri kuyucuklara eklenmiştir. Örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde plakalara yüklenmiştir. PCR reaksiyonu, uygun termal profilde (98 °C'de 30 sn, [95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn] x 40 döngü; ardından melt analysis için 55 °C'den 95 °C'ye 0,5 sn) gerçekleştirilmiştir. Kullanılan genler ve primer çiftlerinin DNA dizileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

3.6.4. qPCR Analizi

Real time PCR analiz çalışmaları için Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazının CFX Manager programı kullanılmıştır. Cihazdan ham veriler (Ct değerleri) alınarak kontrol (sadece araç uygulanan grup), MANF ve CDNF uygulanan gruplar için 3 farklı zaman noktasında 17 genin verileri hem ipsilateral hem de kontralateral bölgeler için olmak üzere ayrı ayrı düzenlenmiştir. *Cycle threshold* (Ct) değerleri, 2 endojen (GAPDH ve β -aktin) kontrole göre normalize edilerek $[\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT((GAPDH + \beta\text{-aktin})/2)]$ ΔCt değeri hesaplanmıştır. Her bir zaman noktasında, kontrolün ΔCT değeri kalibratör olarak kullanılmış ve $[\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{örnek}) - \Delta CT(\text{kalibratör})]$ formülüne göre $\Delta \Delta CT$ değeri hesaplanmıştır. Grupların kontrollerine göre kat değişimleri, relatif kantifikasyon (RQ) formülü uygulanarak $[2^{-\Delta \Delta Ct}]$ hesaplanmıştır. MANF veya CDNF uygulanan gruplar, her bir zaman noktasında ve ipsilateral ve kontralateral hemisferler için kendi kontrol grubu ile

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

3.7. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili testler

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

3.7.1. El çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi

Bu test sırasında sol pençeler tıbbi bant (3M transpore tıbbi flaster, 1527, 3M, ABD) ile fiks edilerek her iki ön pençenin kavrama gücü veya sağ ön tek pençenin kavrama gücü ölçülmüştür. Bu test için ucuna üçgen çelik tel tutturulan yaylı bir Newton metre (Medio-Line Spring Scale, metric, 300 g, Pesola AG, Switzerland) kullanılmıştır. Fareler yaklaştırıldıklarında üçgen teli içgüdüsel olarak tutmakta ve kuyruklarından geriye çekildiklerinde kavrama güçleri oranında bırakmamaya çalışmaktadırlar. Kontrol, CDFN veya MANF uygulanan farelere bu test uygulanmış ve bırakmak zorunda kaldıkları güç kaydedilmiştir. Farelerin sağlam olan sol eli bantla bağlanarak felçli sağ elin kavrama gücü Newton cinsinden hesaplanmıştır. Her test 5 kez tekrarlanmış ve ortalama değer alınmıştır. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (Kilic vd., 2014).

3.7.2. RotaRot ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi

Beyin felci sonrasındaki motor koordinasyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi amacıyla fareler kendi çevresinde hızı giderek artan (4'den 40 rpm'e 245 saniyede) bir silindir üzerine yerleştirilmiş ve farelerin bu silindir üzerinde kalabildikleri süre değerlendirilmiştir. Her test 5 kez tekrarlanmış ve ortalama değer alınmıştır. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (Kilic vd., 2014).

3.7.3. Yükseltilmiş O-labirenti ile anksiyetenin değerlendirilmesi

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

endişe ve korku belirtisi olarak değerlendirilmektedir. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (Kilic vd., 2014).

3.7.4. Açık alan testi ile motor aktivitelerin değerlendirilmesi

Farelerin spontan motor aktivitelerinin ve alandaki araştırma benzeri davranışlarının değerlendirildiği bir metottur. 150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde bir ucu kapalı silindirden oluşan bir alanda fareler 10 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Kameraya bağlı bir bilgisayar ile Anymaze programı kullanılarak silindir sanal olarak 3 bölgeye ayrılmış ve farelerin hem bu bölgelere giriş çıkış süreleri hem de bu bölgelerde geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde gruplar arasında ve zamana göre karşılaştırılmıştır (Kilic vd., 2014).

3.8. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın belirlenmesi

Uzun dönemde aksonal projeksiyonun belirlenmesi için, 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvana 42. gün davranış deneyleri bittikten sonra anterograd trakt traseri olan Biyotinlenmiş Dekstran Amin (BDA) enjeksiyonu yapılmıştır. BDA enjekte edilen farelere enjeksiyondan 10 gün sonra daha önce belirtilen şekilde % 0,9'luk NaCl ile transkardiyal perfüzyon uygulanmıştır. Daha sonra farelerin beyinleri çıkarılmış, çıkarılan beyinler +4 °C'de 3 saat daha % 4'lük PFA çözeltisinde inkübe edilmiş, son olarak da % 30'luk sükröz çözeltisinde +4 °C'de çökene kadar bekletilmiştir. Çöken beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuş ve kryostat cihazı kullanılarak fasiyel nükleus seviyesinden (Bregma -5.8 ile -6.3 mm arası) 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler boyama yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır. -80 °C'dan çıkarılan kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisinde yıkandıktan sonra normal keçi serumla 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama sonrası kesitler 90 dakika boyunca oda sıcaklığında strepavidin bağlanmış AlexaFluor 555 (S21381, Invitrogen, ABD) ile konjuge edilmiş sekonder antikorla inkübe edilmiştir. Boyamaların ardından kesitlerin üzeri, uygun kapatma sıvısı ve lamelle kapatılmış ve görüntüleme işlemi Axiozoom (Zeiss, Almanya) floresan mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. İki hemisfer arasındaki orta hattan çizilen 1000 µm'lik sanal çizgiyi (Şekil 6.21. kırmızı ile gösterilen çizgi) geçen aksonlar sayılmış ve her grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Kilic vd., 2014).

3.9. İstatistik

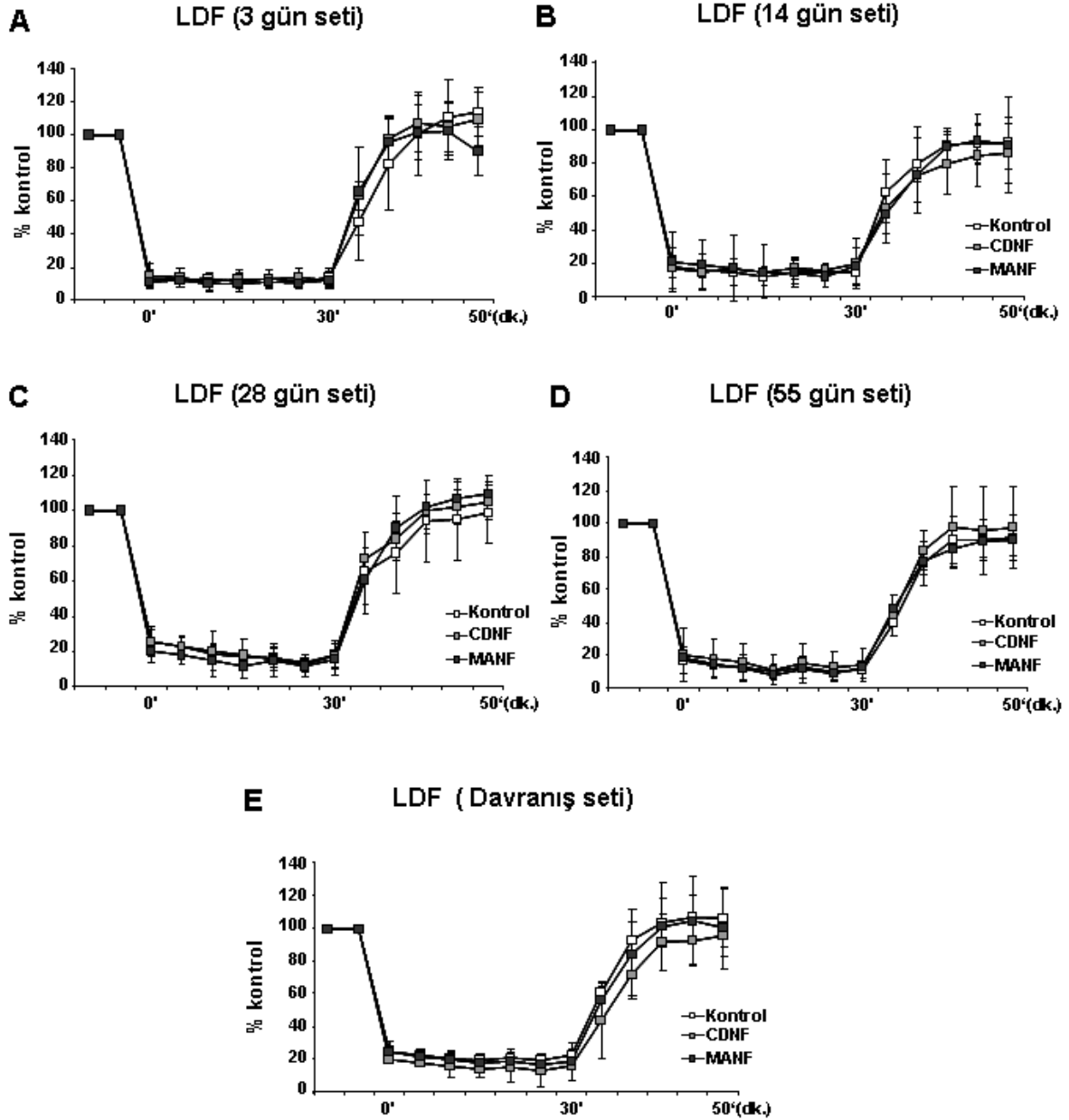
Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla SPSS programı kullanılarak istatistiksel testler yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü (*one-way*) varyans analizi (*Analysis of variation*, ANOVA) kullanılarak, en düşük anlamlı farklılık testiyle analiz edilmiştir

(*least significant difference, LSD test*). Davranış deneylerinde sonuçların zamana bağlı olarak değerlendirilmesi için tekrarlı ölçümler varyans analizi (*repeated measurements, ANOVA*) yapılmıştır. Bütün değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş, * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir (Kilic vd., 2014).

4. BULGULAR

4.1. Serebral kan akımının ölçülmesi

Serebral Kanlanma



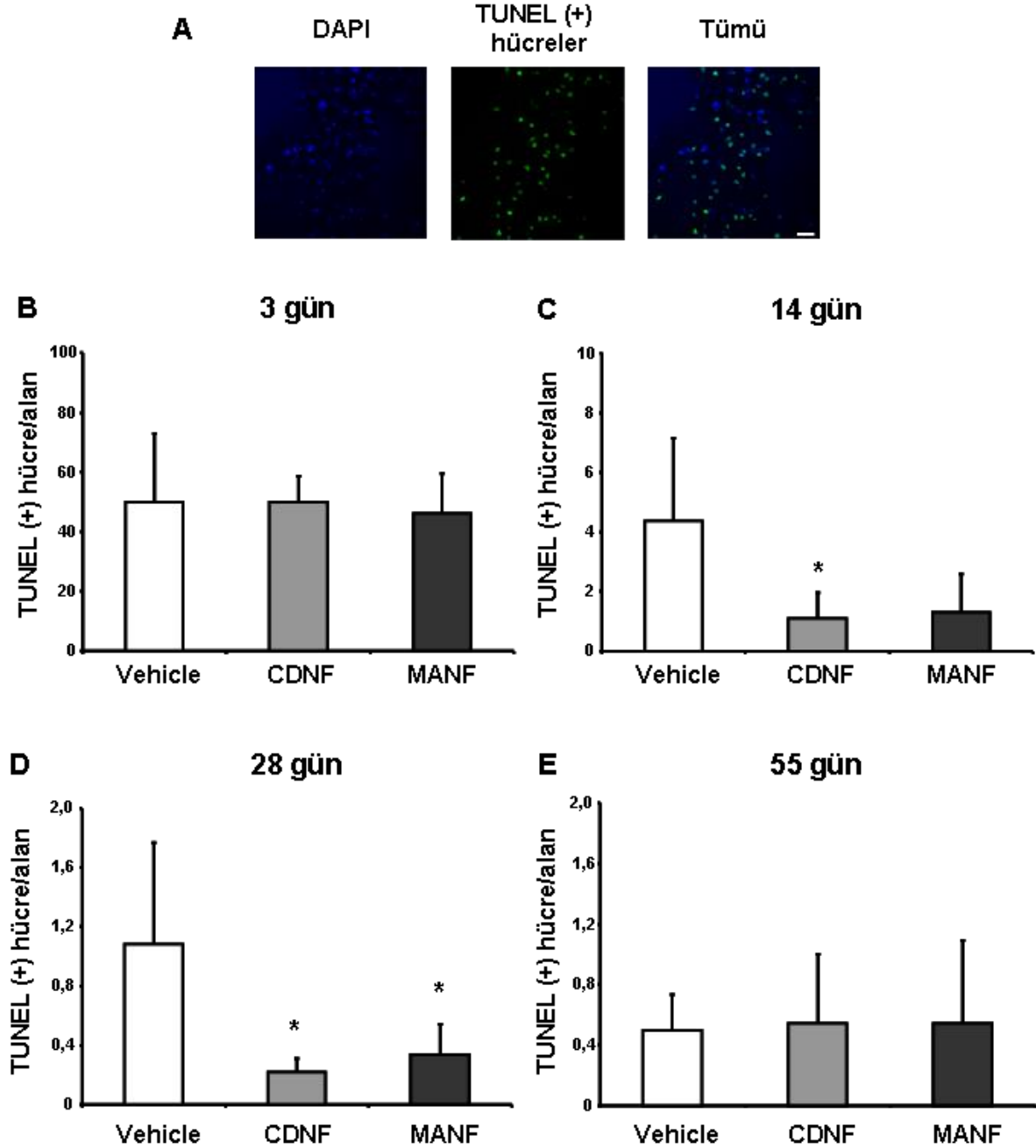
Şekil 4.1.1. Orta serebral arter bölgesinden alınan Laser Doppler akım (LDF) kaydı. (A) 3 gün seti, (B) 14 gün seti (C) 28 gün seti, (D) 55 gün seti ve (E) davranış setleri için.

Deneyisel iskemi modelinin oluşturulması, hasar süresinin kontrolü ve reperfüzyondaki kanlanmanın değerlendirilebilmesi için hayvanların serebral kan akımları Laser Doppler flowmetre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler iskemiden 15 dakika önce başlamış, 30 dakika iskemi ve 20 dakika reperfüzyon süresince devam etmiştir. Sonuçlar incelendiğinde

herhangi bir zaman noktasında (3 gün, 14 gün, 28 gün, 55 gün ve davranış deney setleri için) serebral kan akımında gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 4.1.1.).

4.2. Apoptotik hücre sayısının değerlendirilmesi

DNA Kırıklarının Analizi

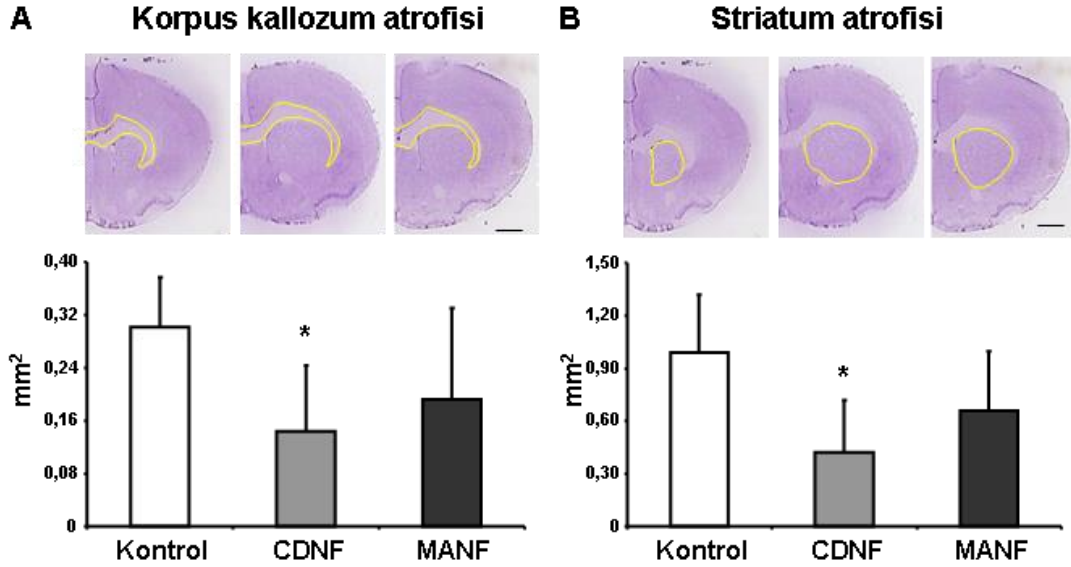


Şekil 4.2.1. Zamana bağlı olarak apoptoz değerlendirilmesi. (A) Temsili TUNEL boyaması ve günlere bağlı değerler, (B) 3 gün, (C) 14 gün, (D) 28 gün ve (E) 55 gün.

Yapılan CDNF veya MANF tedavileri sonrası DNA kırıklarının değerlendirilmesi için alınan kesitler in-situ hücre ölümü tespit kiti (*in-situ Cell Death Detection kit*) kullanılarak boyanmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskopta (LSM760, Zeiss, Almanya)

görüntülenmiş, striatuma belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Hem 14 gün hem de 28 gün sonra sonlandırılan deney setinde kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi apoptotik hücre ölümünü anlamlı derecede azaltmıştır (14. gün $p=0,042$, 28.gün CDNF $p=0,13$, MANF $p=0,19$). Üç günlük ve 55 günlük deney setinde ise gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 4.2.1). Bar 100 μm 'dir.

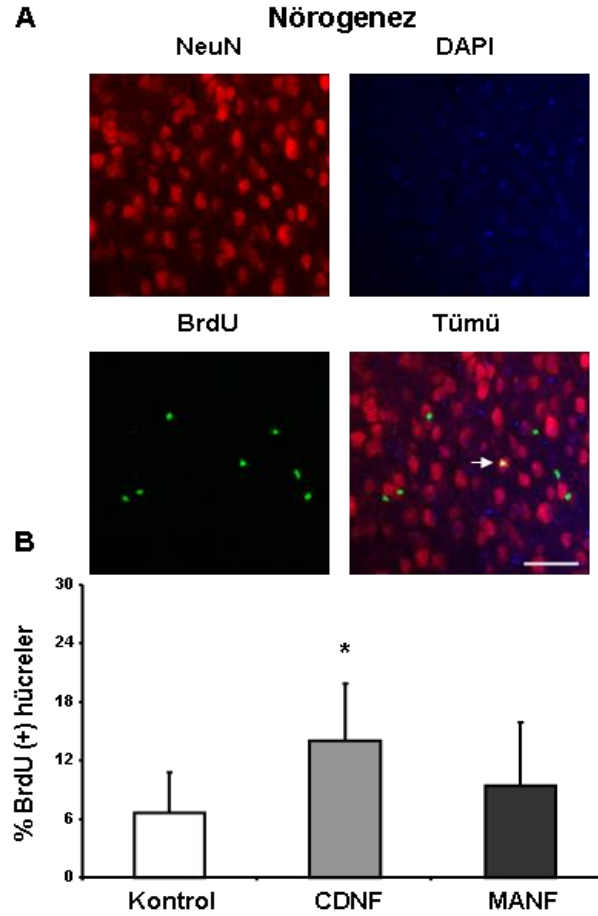
4.3. İskemi sonrası uzun dönemde atrofinin belirlenmesi



Şekil 4.3.1. Korpus kallozumdaki (A) ve striatumdaki (B) post-iskemik atrofinin *cresyl violet* boyaması yapılarak değerlendirilmesi.

Atrofinin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine *cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası kesitler fotoğraflanmış, hasarlı ve hasarsız korpus kollozumları ve striatmaları Image J programı kullanılarak ölçülmüştür. Hasarsız ölçülen alandan hasarlı alanın çıkarılması ile atrofi alanları hesaplanmış ve grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi hem korpus kollozum hem striatumdaki atrofiyi anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.3.1., korpus kallozum $p=0,049$, striatum $p=0,013$). Bar 500 μm 'dir.

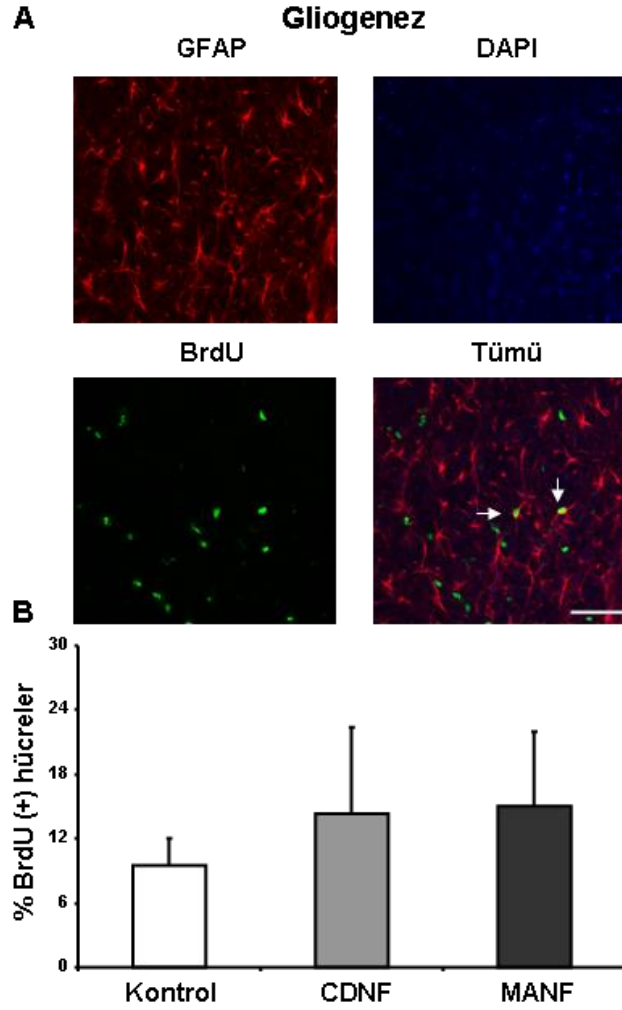
4.4. Nöroenez belirlenmesi



Şekil 4.4.1 Nöroenezin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/NeuN boyaması (A) ve değerler (B).

Nöroenez belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine NeuN+/BrdU+ ikili immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Nöroenez için iskemik hemisferde belirlenen alanlardaki NeuN ve BrdU boyamalarının üst üste geldiği hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi uzun dönemde nöroenezi istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.4.1., $p=0,047$). Bar 150 μm 'dir.

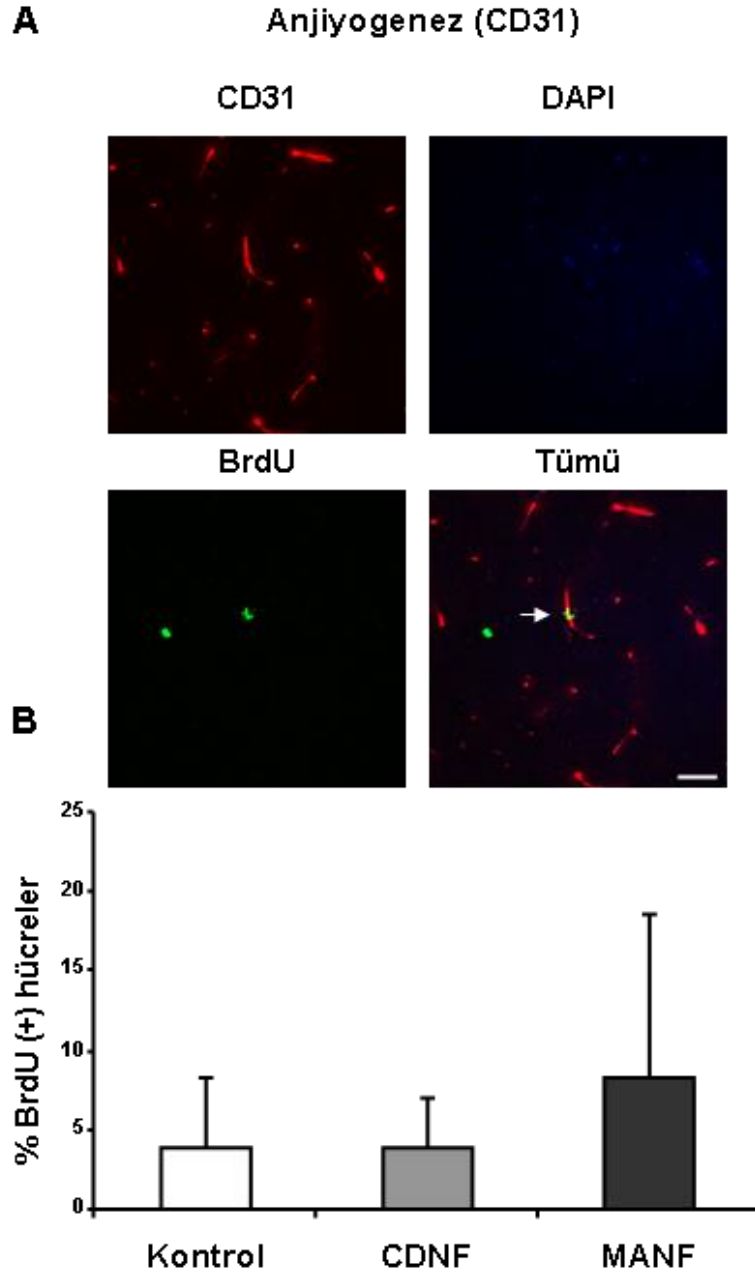
4.5. Gliogenezin belirlenmesi



Şekil 4.5.1. Gliogenezin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/GFAP boyaması (A) ve değerler (B).

Gliogenezin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine GFAP+/BrdU+ immünofloresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Gliogenez için iskemik hemisferde GFAP ve BrdU boyamalarının üst üste gelmiş olduğu hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında hem CDNF, hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da gliogenez artırmıştır (Şekil 4.5.1). Bar 150 µm'dir.

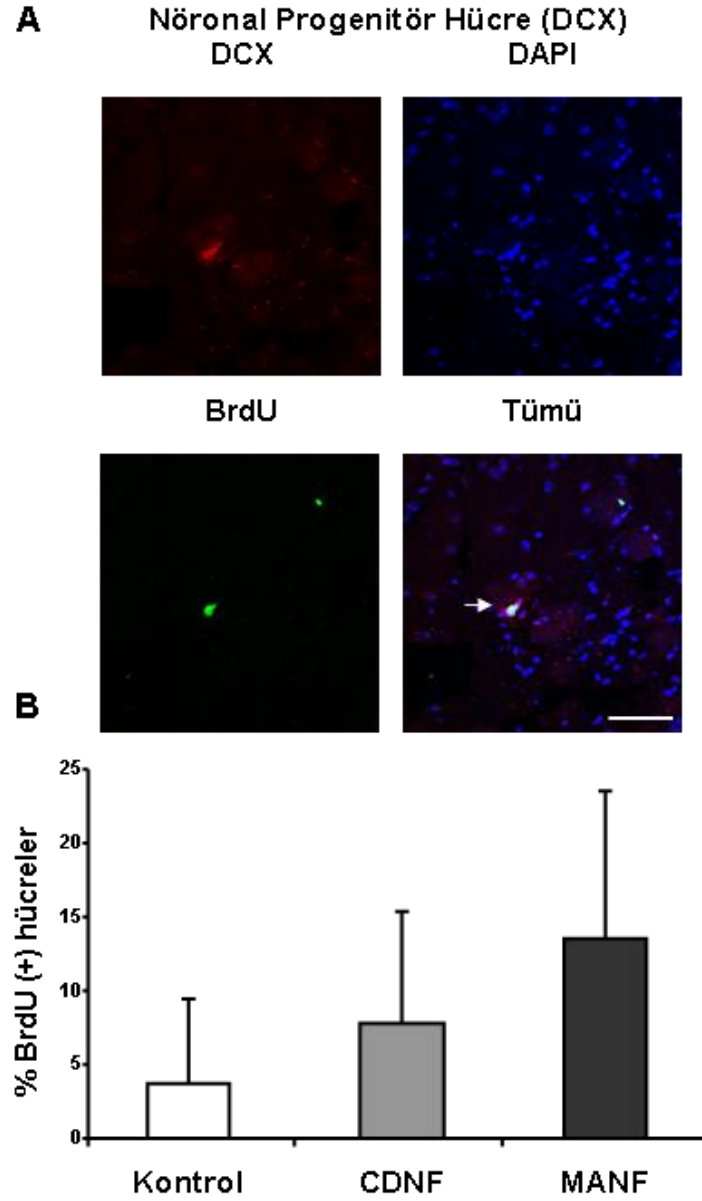
4.6. Anjiyogenezin belirlenmesi



Şekil 4.6.1 Anjiyogenezin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/CD31 boyaması (A) ve değerler (B).

Anjiyogenezin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine CD31+/BrdU+ ikili immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Nörogenez için iskemik hemisferde belirlenen alanlardaki CD31 ve BrdU boyamalarının üst üste geldiği hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında MANF tedavisi uzun dönemde anjiyogenez istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırmıştır (Şekil 4.6.1.). Bar 150 µm'dir.

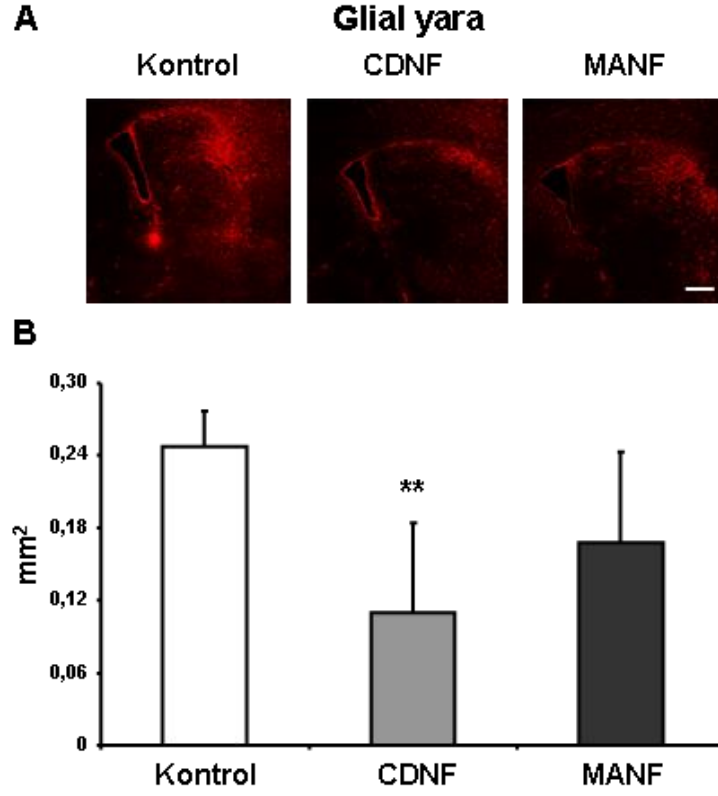
4.7. Nöronal Progenitör Hücrelerin belirlenmesi



Şekil 4.7.1 Nöronal Progenitör Hücrelerin değerlendirilmesi. Temsili BrdU/DCX boyaması (A) ve değerler (B).

Nöronal progenitör hücrelerin belirlenmesi için 55 günlük deney setinin kesitlerine Doublecortin+/BrdU+ ikili immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Daha sonra boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM760, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Nörogenez için iskemik hemisferde belirlenen alanlardaki Doublecortin ve BrdU boyamalarının üst üste geldiği hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hem CDNF hem de MANF tedavisi uzun dönemde nöronal progenitör hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırmıştır (Şekil 4.7.1.). Bar 150 µm'dir.

4.8. Glial yaranın belirlenmesi

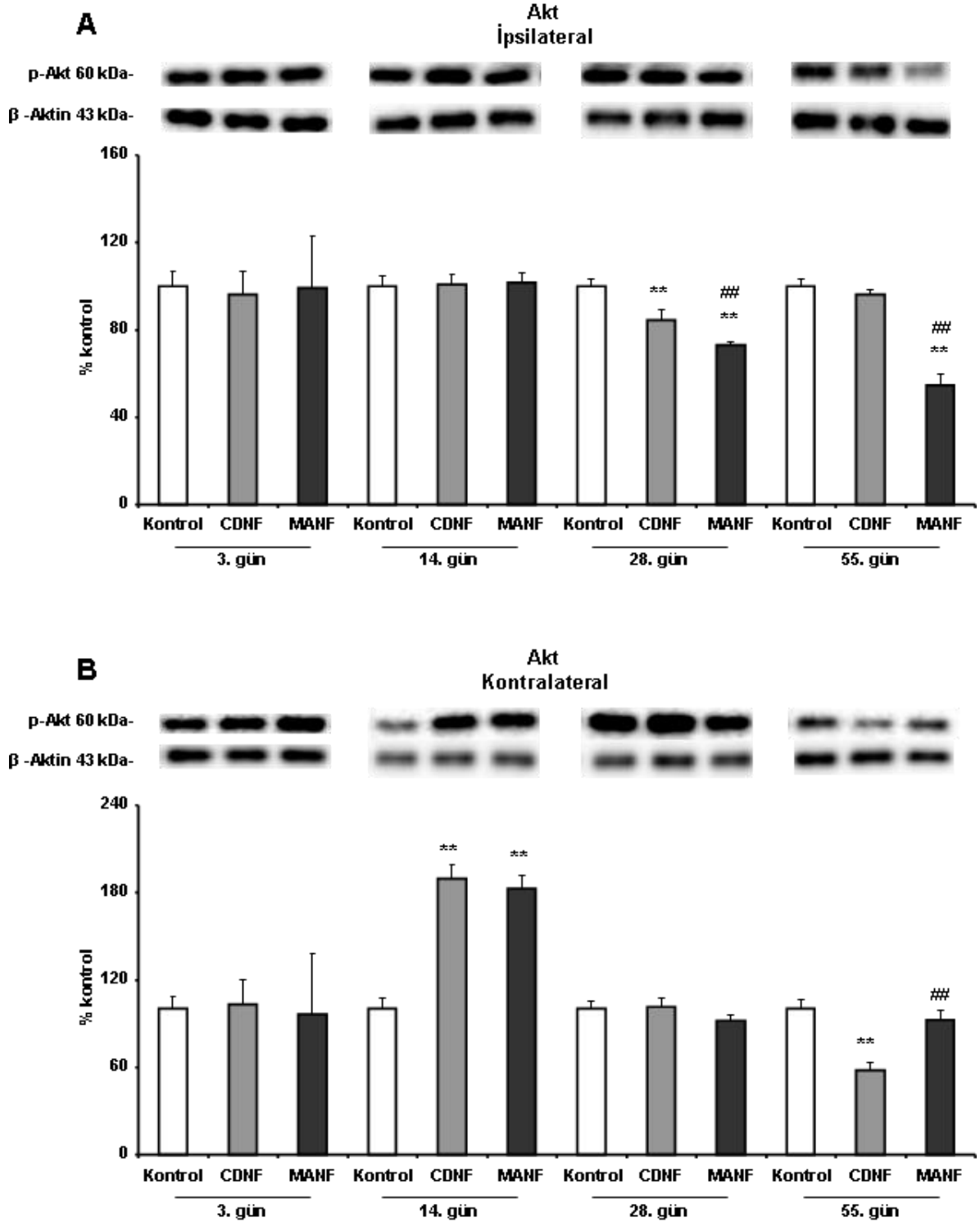


Şekil 4.8.1 Temsili glial yara için GFAP boyaması (A) ve glial yara değerlendirilmesi (B).

Glial yaranın belirlenmesi için GFAP boyanan kesitlerin hasarlı hemisferi konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir. Glial yara alanı Zen Blue programı kullanılarak ölçülmüş ve grupların ortalaması alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDNF tedavisi glial yarayı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.6.1., $p=0,003$). Bar 100 μm 'dir.

4.9. İskemi sonrası protein seviyesindeki değişiklikler

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

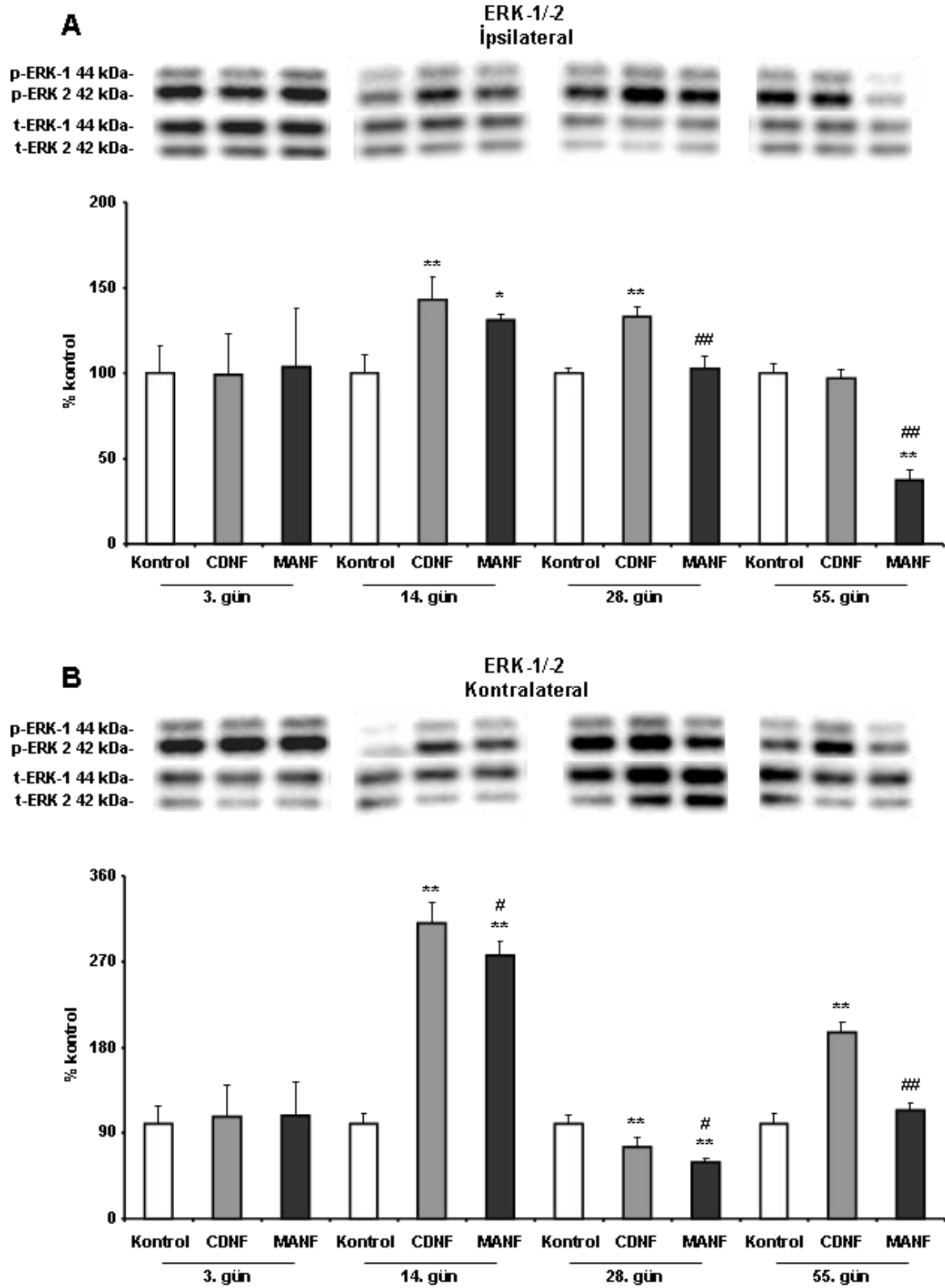


Şekil 4.9.1.1 İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-Akt anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-Akt seviyesi 3. ve 14. gün sonunda gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-Akt seviyesini 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde MANF tedavisi CDNF grubuna göre fosfo-Akt seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. 55. günde ise MANF tedavisi hem kontrol hem de CDNF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fosfo Akt seviyesini azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-Akt seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-Akt seviyesini 14. günde hem MANF tedavisi hem de CDNF tedavisi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde ise CDNF tedavisi kontrol grubuna göre fosfo-Akt seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. Ayrıca MANF tedavisi CDNF tedavisine göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fosfo-Akt seviyesini arttırmıştır. (Şekil 4.9.1.1., **p<0,01, ###p<0,01).

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

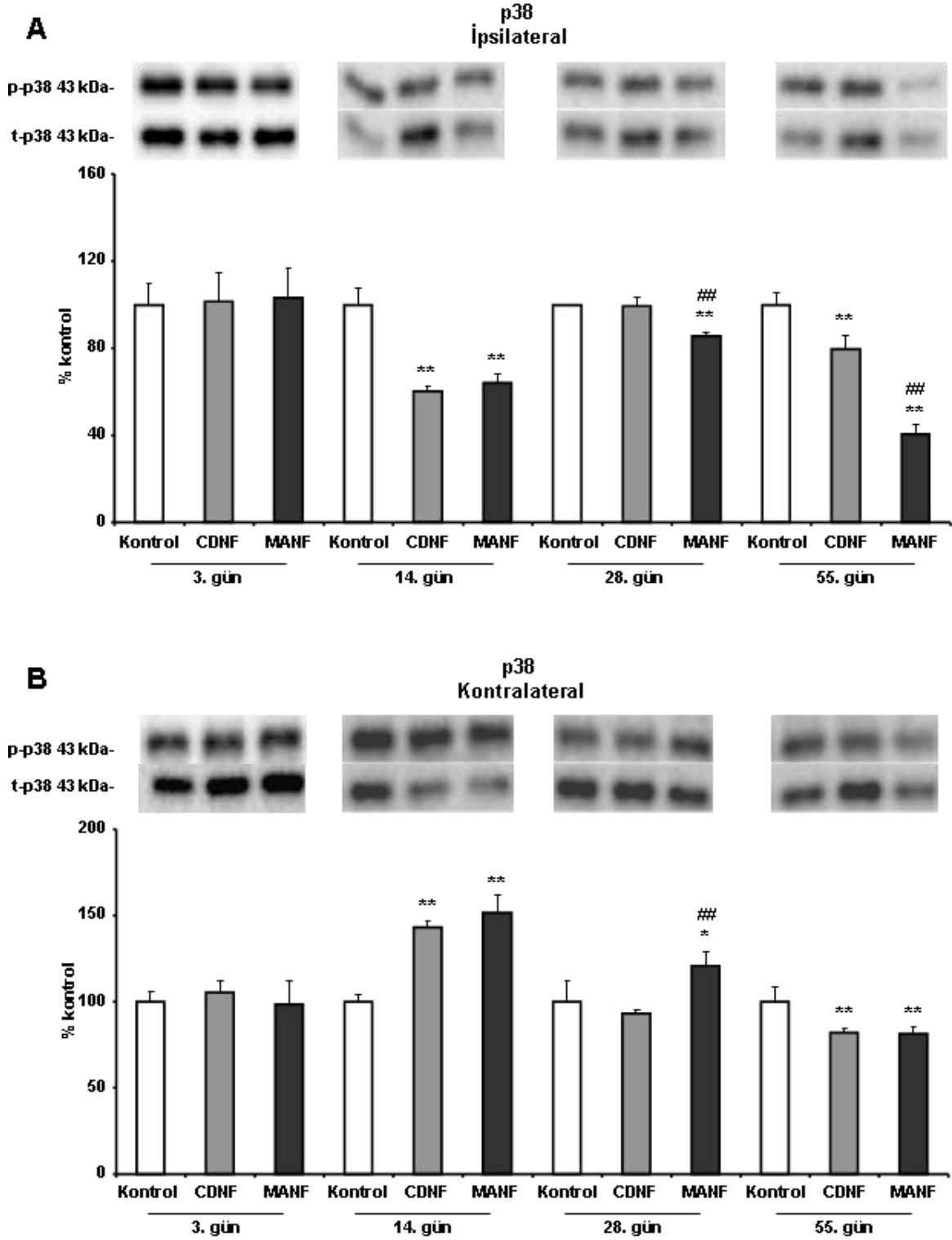


Şekil 4.9.2.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p44/-42 anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-p44/-42 seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-p44/-42 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde ise MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-p44/-42 seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-p44/-42 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmış, 55. günde ise CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırırken, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 4.9.2.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

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

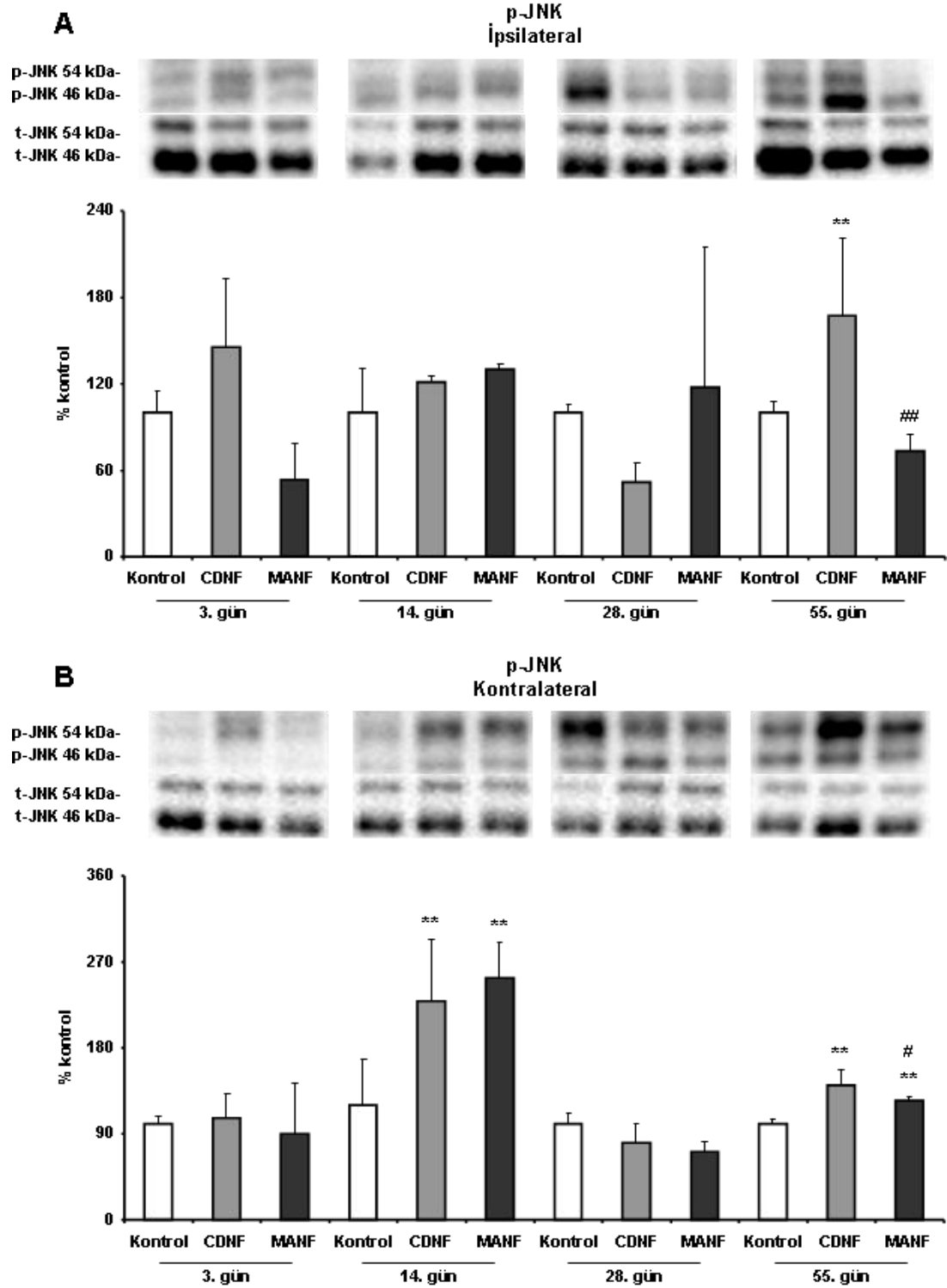


Şekil 4.9.3.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-p38 anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-p38 seviyesi 3. günde guplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-p38 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi, 28. günde sadece MANF tedavisi, 55. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-p38 seviyesi 3. günde guplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Fosfo-p38 seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi, 28. günde sadece MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.9.3.1., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ### $p < 0,01$).

4.9.4. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-JNK anlatımına etkisi

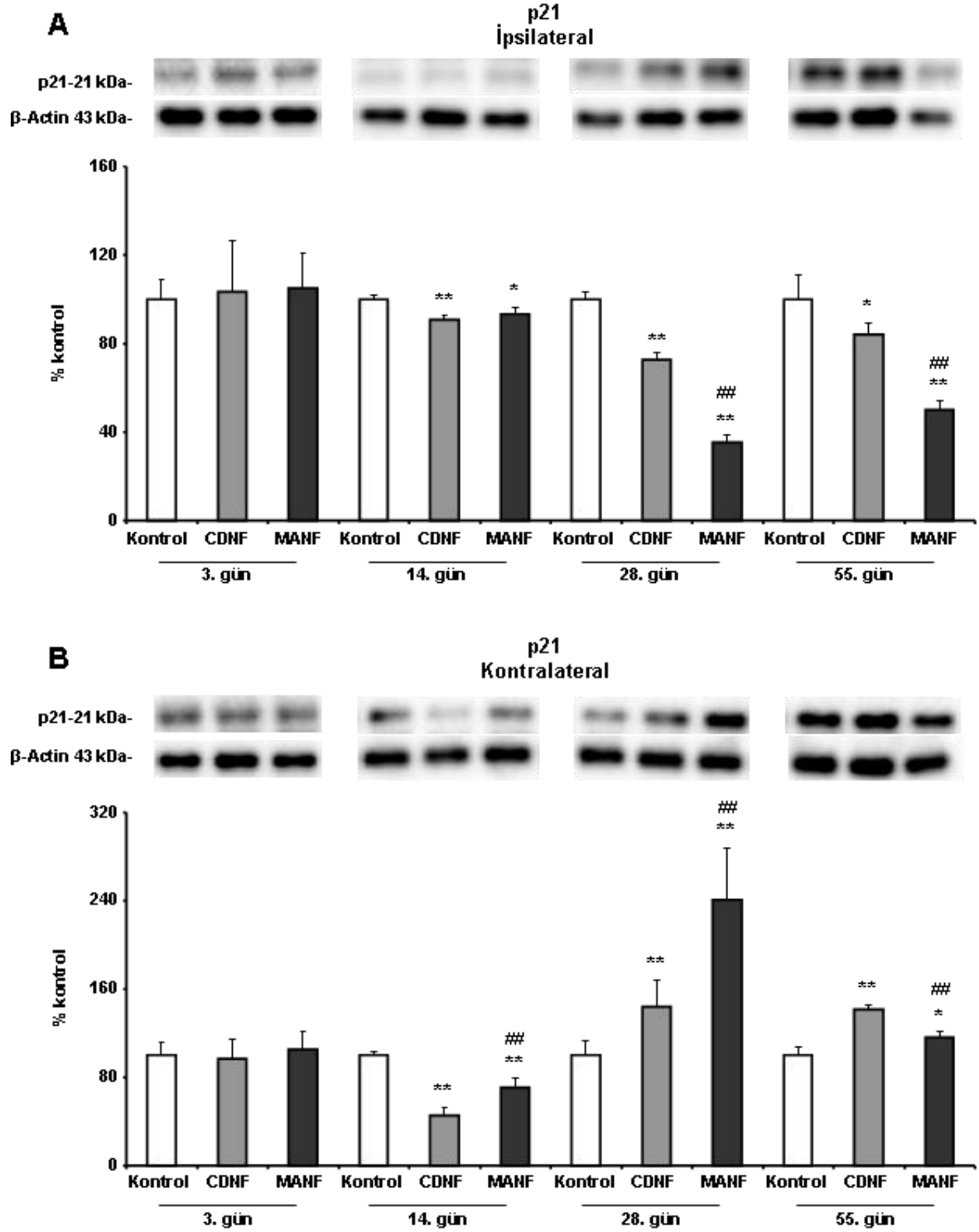


Şekil 4.9.4.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak fosfo-JNK anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda fosfo-JNK seviyesi 3. gün sonunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Fosfo-JNK seviyesi 14. günde de 28. günde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. 55. günde kontrol grubuyla kıyaslandığında CDNF tedavisi ipsilateral striatumda fosfo-JNK seviyesini anlamlı olarak artırırken, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip değildir. Ancak, CDNF ile kıyaslandığında MANF tedavisi ile fosfo-JNK seviyesi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda fosfo-JNK seviyesinde 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Fosfo-JNK seviyesi 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Bununla birlikte, 28. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına karşın, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi fosfo-JNK seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Şekil 4.9.4.1., **p<0,01; #p<0,05; ###p<0,01).

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



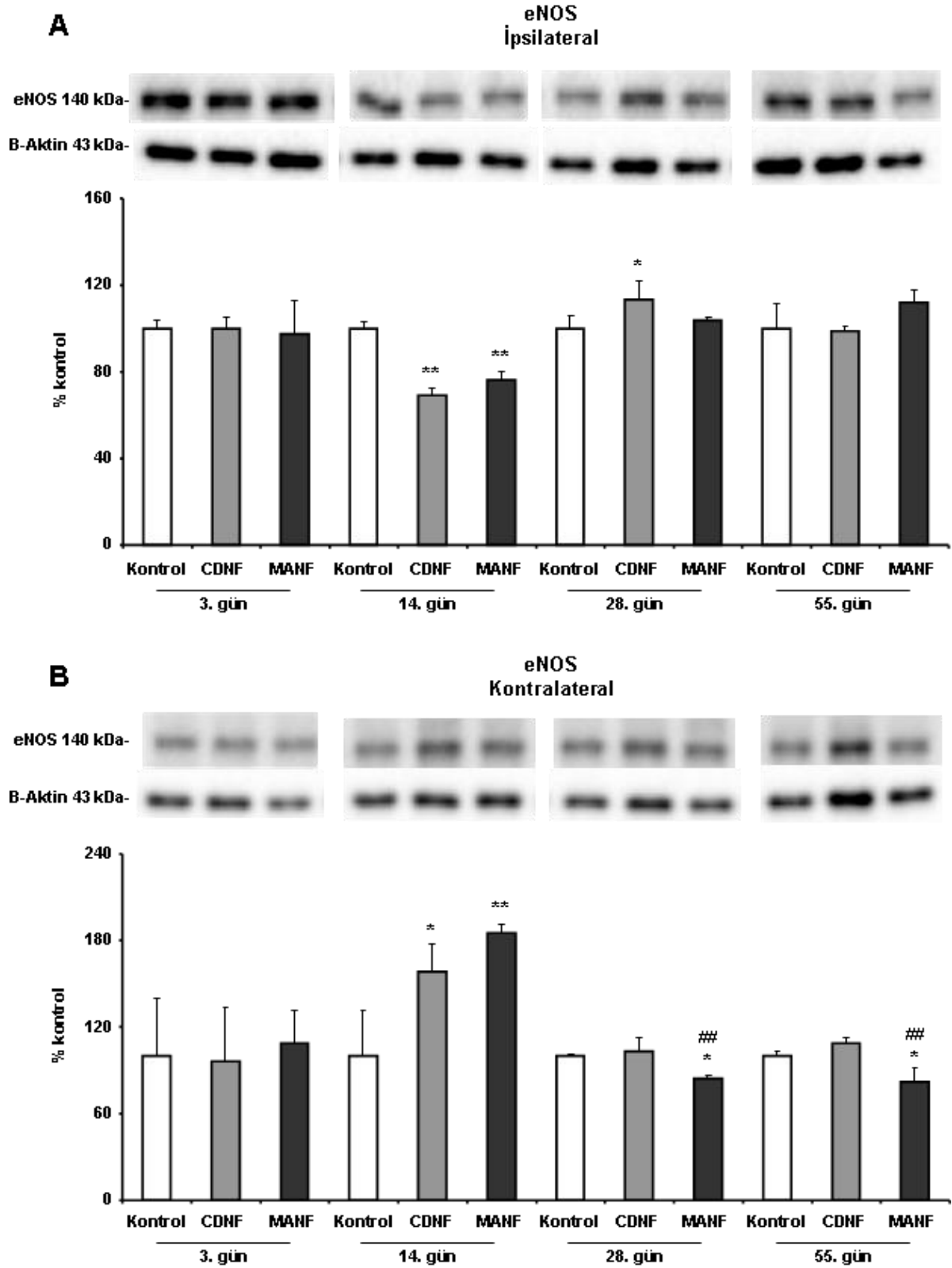
Şekil 4.9.5.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak p21 anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda p21 seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. p21 seviyesini 14. günde, 28. günde ve

55. günlerde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda p21 seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. p21 seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde ve 55. günlerde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.9.5.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, ### $p<0,01$).

4.9.6. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak eNOS anlatımına etkisi

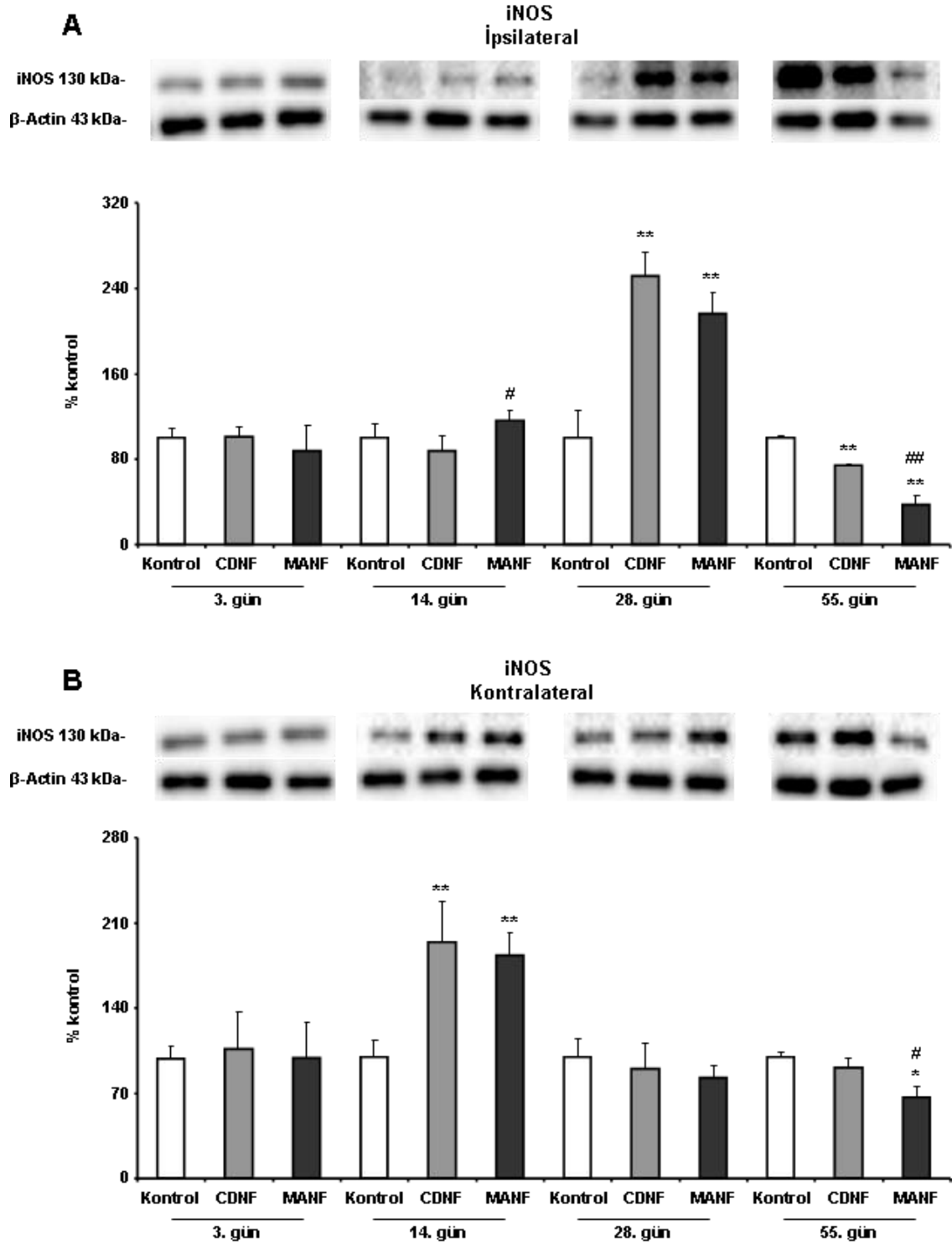


Şekil 4.9.6.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak eNOS anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda eNOS seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. eNOS seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde CDFN tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda eNOS seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. eNOS seviyesini 14. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde ve 55. günlerde ise MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.9.6.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, ### $p<0,01$).

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

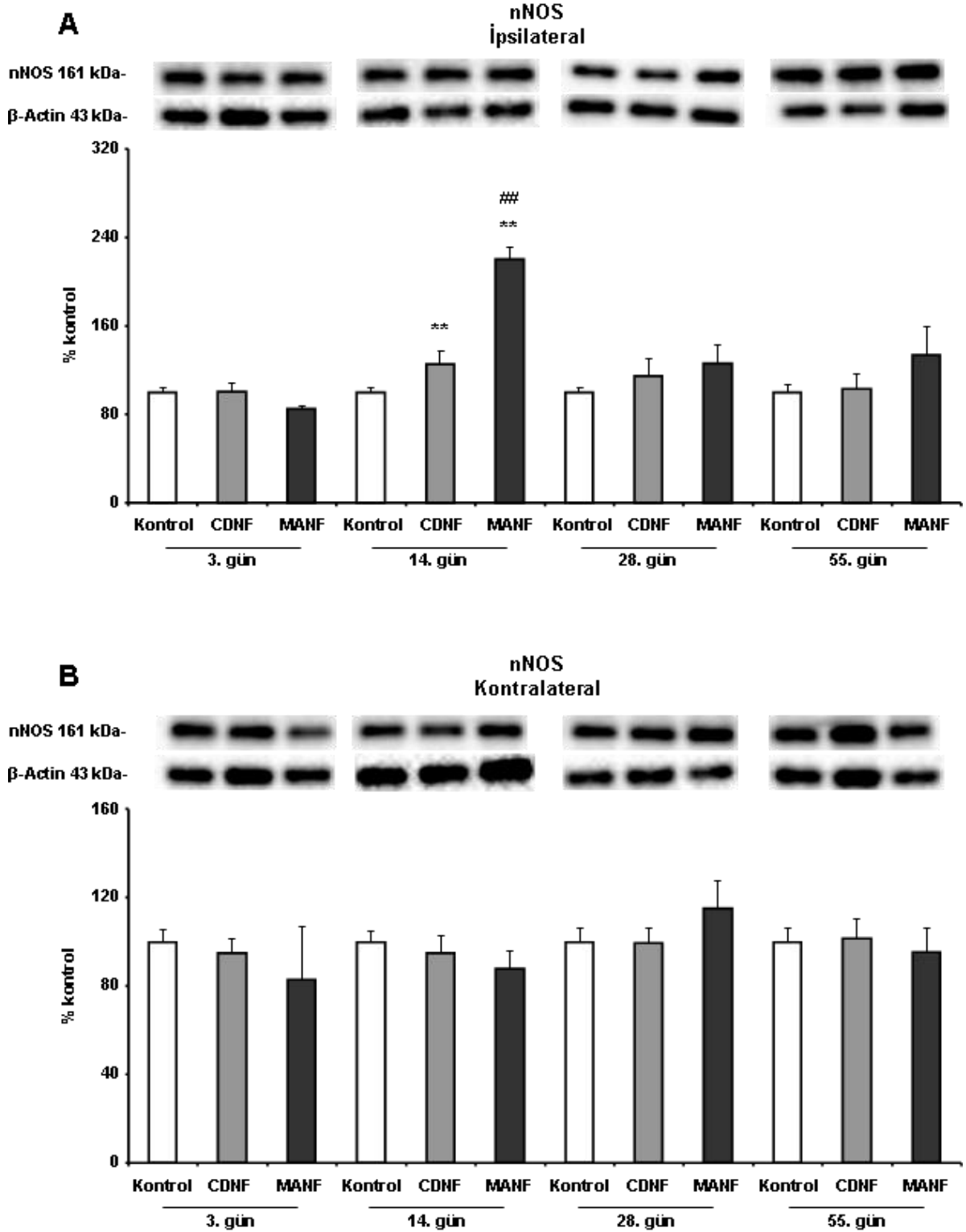


Şekil 4.9.7.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak iNOS anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda iNOS seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. iNOS seviyesini 14. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda iNOS seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. iNOS seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.9.7.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

4.9.8. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak nNOS anlatımına etkisi

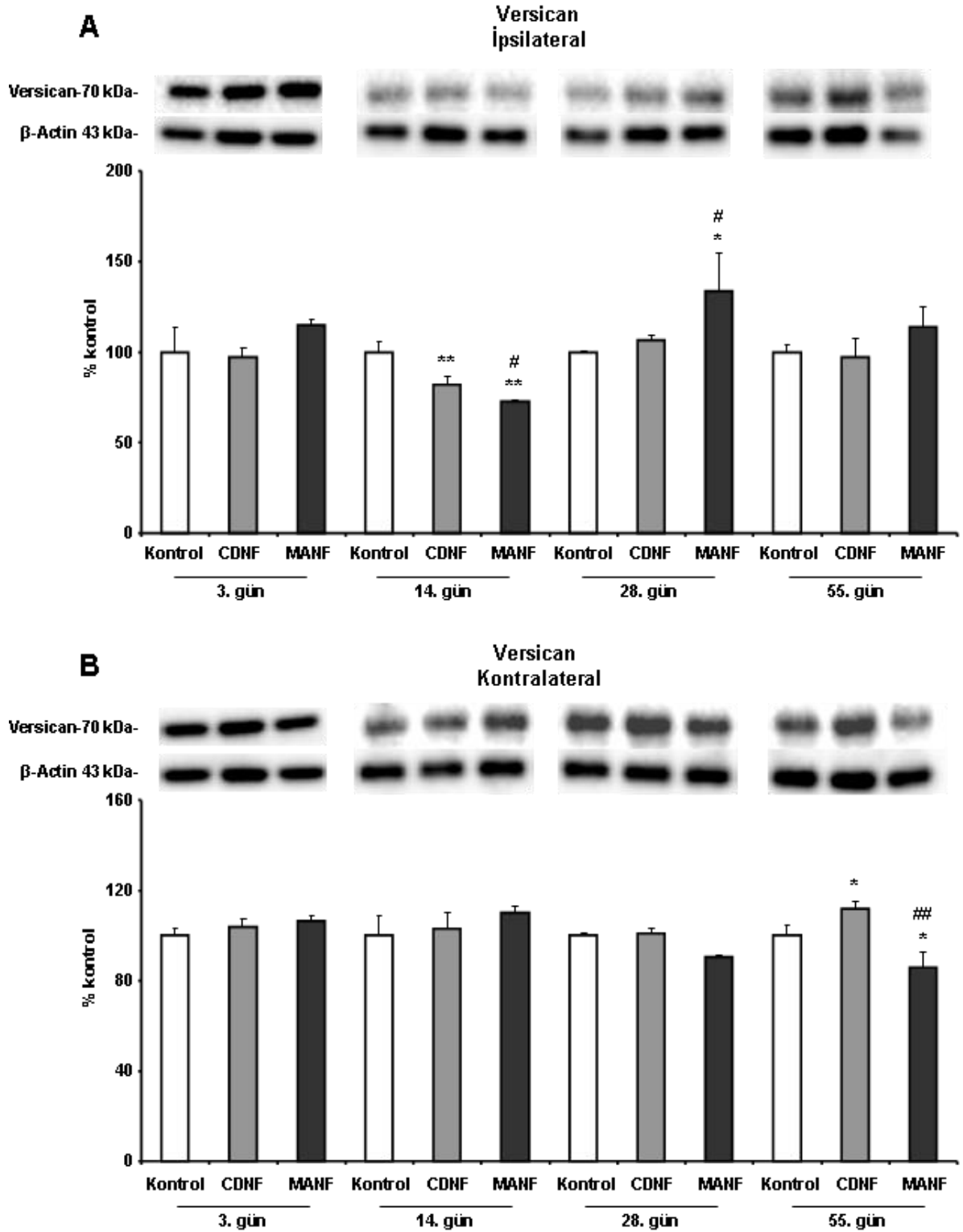


Şekil 4.9.8.1 İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak nNOS anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda nNOS seviyesi 3., 28. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 14. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi ile birlikte nNOS seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde artmıştır. Ayrıca MANF tedavisi CDNF grubuna kıyasla nNOS seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.9.8.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda nNOS seviyesi 3., 14., 28. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.

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

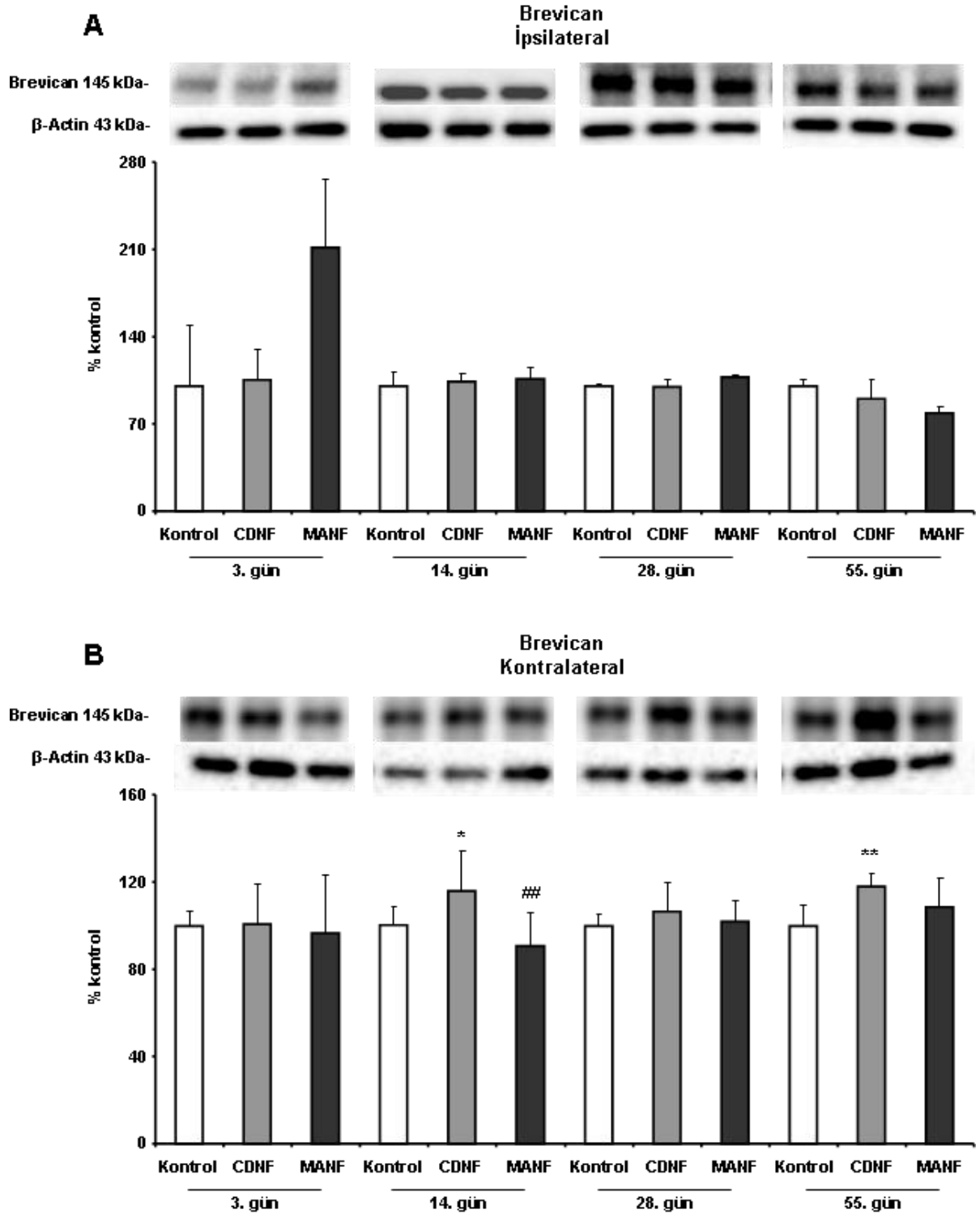


Şekil 4.9.9.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Versican anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda Versican seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Versican seviyesini 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, 55. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda Versican seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Versican seviyesini 14. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmış, 28. günde MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmış, 55. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmış, MANF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.9.9.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

4.9.10. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Brevican anlatımına etkisi

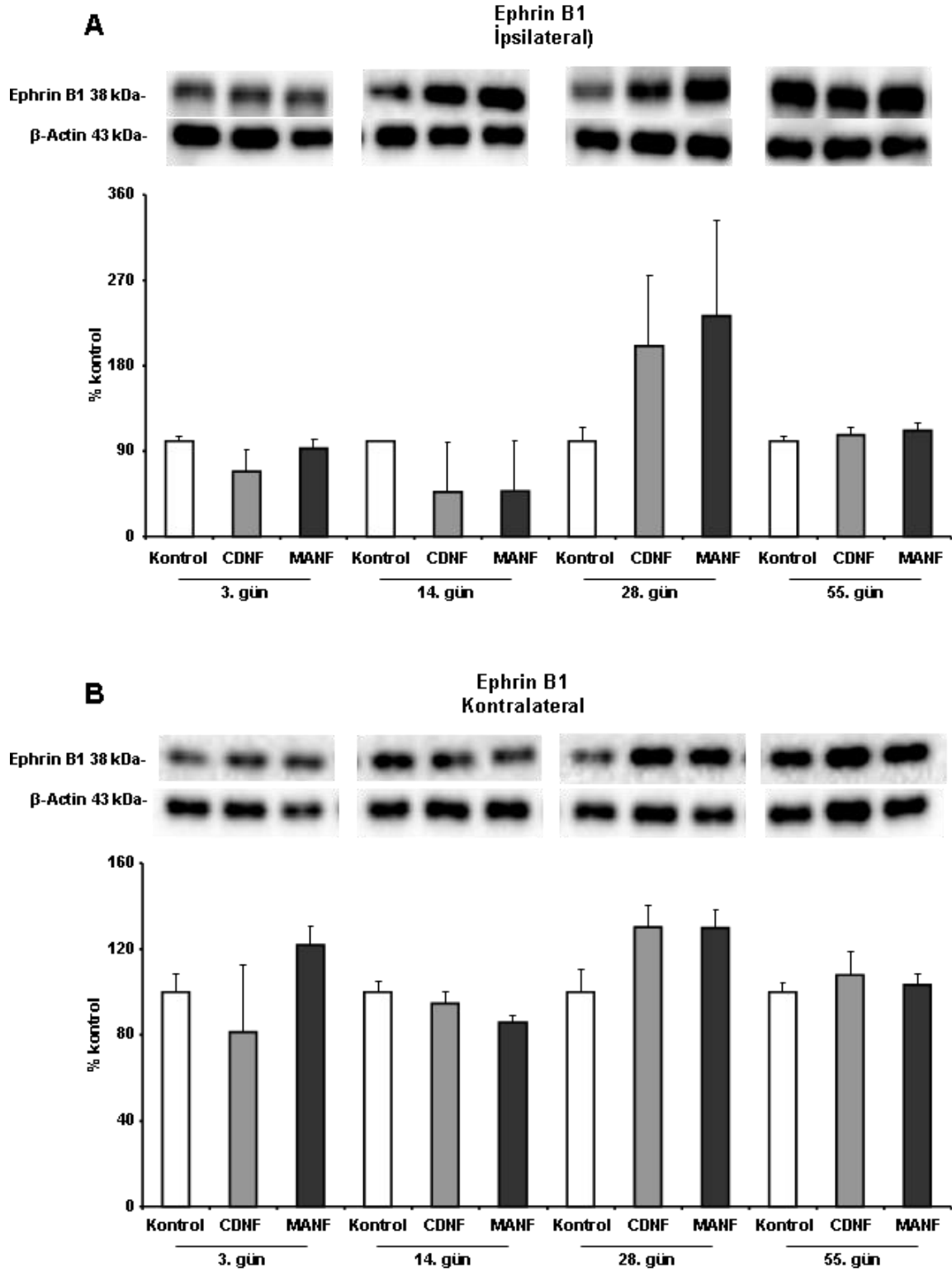


Şekil 4.9.10.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Brevican anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda Brevican seviyesi 3., 14., 28. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda Brevican seviyesi 14., 28. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 3. günde ise MANF tedavisi ile birlikte Brevican seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde artmıştır (Şekil 4.9.10.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

4.9.11. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B1 anlatımına etkisi

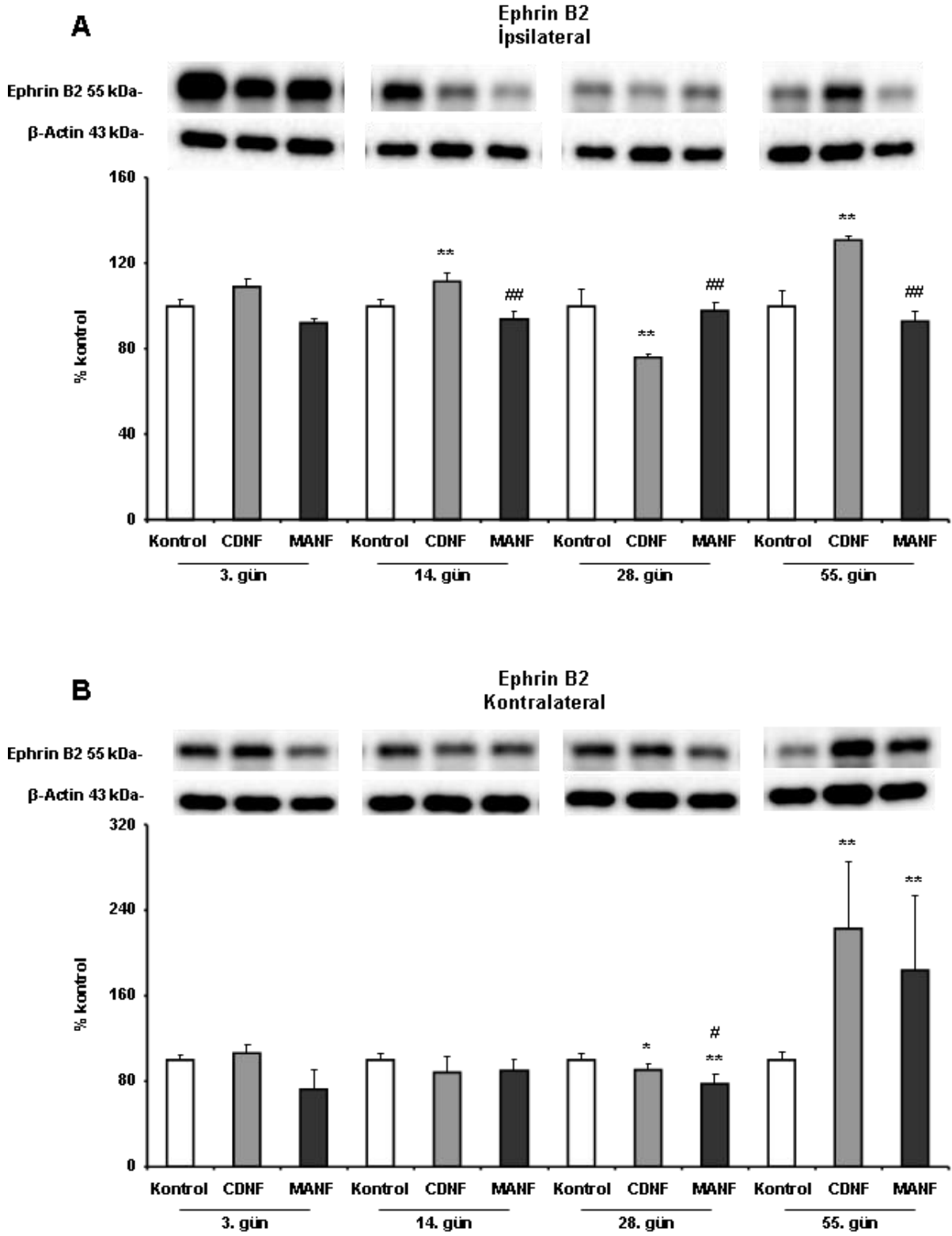


Şekil 4.9.11.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B1 anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda Efrin B1 seviyesi 3., 14. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 28. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda Efrin B1 seviyesi 14. ve 55. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 3. günde ise MANF tedavisi ile birlikte, 28. günde de hem CDNF hem de MANF tedavisi ile birlikte Efrin B1 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde artmıştır (Şekil 4.9.11.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

4.9.12. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B2 anlatımına etkisi



Şekil 4.9.12.1. İskemi sonrası CDNF ve MANF tedavisinin zamana bağlı olarak Efrin B2 anlatımına etkisi.

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda Efrin B2 seviyesi 3. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 14. ve 55. günde efrin B2 seviyesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artarken, 28. günde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. MANF tedavisi ise 14., 28. ve 55. günde CDNF grubuna göre efrin B2 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda Efrin B2 seviyesi 3. ve 14. günde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. 28. günde ise CDNF tedavisi ile birlikte Efrin B2 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde azalırken, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi ile birlikte Efrin B2 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde artmıştır (Şekil 4.9.12.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$).

4.10 İskemik sonrası gen ekspresyon değişiklikleri

4.10.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)

Tablo 4.10.1.1 İpsilateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi

İnterlökin-1 Beta (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,35±0,06*	0,34±0,09*	0,10±0,03*	0,05±0,00*	0,75±0,11*	1,34±0,16*	0,13±0,03*	0,32±0,03*
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,35±0,02*	0,41±0,14*	0,09±0,00*	0,06±0,01*	0,76±0,15	0,83±0,24	0,14±0,02*	0,36±0,08*

Tablo 4.10.1.2 Kontralateral striatum ve kortekste IL-1Beta'nın gen seviyesindeki analizi

İnterlökin-1 Beta (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,04±0,32	1,70±1,17	1,41±0,08*	1,11±0,22	1,00±0,43	0,76±0,45	0,15±0,05*	0,40±0,15*
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,68±0,67	1,97±1,40	1,33±0,39	0,66±0,32	1,40±0,75	1,17±0,94	0,15±0,06	0,52±0,04

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,35±0,06 kat ve 0,34±0,09 kat azaltmıştır. Hem 14. günde hem de 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,10±0,03 kat ve 0,05±0,00 kat, 55. günde 0,13±0,02 kat ve 0,32±0,03 kat azaltmıştır. (p<0,05) Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste hem 14. günde hem de 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,09±0,00 kat ve 0,06±0,01 kat, 55. günde 0,14±0,02 kat ve 0,36±0,08 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.1.1., p<0,05).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisiyle birlikte interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde değişmezken, MANF tedavisi interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,70±1,17 kat arttırmıştır. 14. günde sadece CDNF tedavisi interlökin-1beta seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olarak 1,41±0,08 kat artırırken, 55. günde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,15±0,05 kat ve 0,40±0,15 kat azaltmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günlerde CDNF veya MANF tedavileri interlökin-1beta seviyesini gen düzeyinde

istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla $0,15\pm0,06$ kat ve $0,52\pm0,04$ kat azaltmıştır (Tablo 4.10.1.2.).

4.10.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF α)

Tablo 4.10.2.1 İpsilateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi

TNF- α (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,62 $\pm$ 0,05*	1,35 $\pm$ 0,08	0,30 $\pm$ 0,13*	0,48 $\pm$ 0,03*	1,43 $\pm$ 0,76	1,17 $\pm$ 0,65	0,14 $\pm$ 0,02*	0,58 $\pm$ 0,21
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,75 $\pm$ 0,10	1,96 $\pm$ 0,34*	0,24 $\pm$ 0,04*	0,33 $\pm$ 0,10*	1,91 $\pm$ 0,21*	1,93 $\pm$ 0,97	0,14 $\pm$ 0,05*	0,76 $\pm$ 0,19

Tablo 4.10.2.2 Kontralateral striatum ve kortekste TNF-Alfa'nın gen seviyesindeki analizi

TNF- α (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,60 $\pm$ 0,36	2,65 $\pm$ 1,08	0,54 $\pm$ 0,25	0,83 $\pm$ 0,24	0,18 $\pm$ 0,06*	0,61 $\pm$ 0,18	0,13 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,12*
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,36 $\pm$ 0,08	1,40 $\pm$ 0,10	0,13 $\pm$ 0,12	0,19 $\pm$ 0,04*	0,47 $\pm$ 0,26	0,79 $\pm$ 0,46	0,09 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,22

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 0,62 $\pm$ 0,05 kat azaltırken, MANF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,35 $\pm$ 0,08 kat arttırmıştır. 14. günde CDNF veya MANF tedavileri 55. günde ise sadece CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,30 $\pm$ 0,13 kat ve 0,48 $\pm$ 0,03 kat, 55. günde 0,14 $\pm$ 0,02 kat azaltmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 14. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi 55. günde sadece CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 0,24 $\pm$ 0,04 kat ve 0,33 $\pm$ 0,10 kat, 55. günde 0,14 $\pm$ 0,05 kat azaltmış, 28. günde ise sadece CDNF tedavisi TNF-alfa seviyesini istatistiksek olarak anlamlı ölçüde 1,91 $\pm$ 0,21 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.2.1., p<0,05).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltırken, MANF tedavisi ise arttırmıştır. 28. günde CDNF tedavisi, 55. günde ise MANF tedavisi TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,18 $\pm$ 0,06 kat ve 0,42 $\pm$ 0,12 kat azaltmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde MANF tedavisi, TNF-Alfa seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 0,19 $\pm$ 0,04 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.2.2., p<0,05).

4.10.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta ($TGF\beta$)

Tablo 4.10.3.1 İpsilateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi

TGF-β1 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,77±0,05	0,89±0,05	1,46±0,46	1,38±0,51	0,89±0,20	1,74±0,12*	0,38±0,03*	1,18±0,09
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,02±0,14	1,15±0,18	1,04±0,08	1,20±0,12	0,65±0,20	0,67±0,05*	0,35±0,01*	1,39±0,11

Tablo 4.10.3.2 Kontralateral striatum ve kortekste TGF-Beta1'in gen seviyesindeki analizi

TGF-β1 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,80±0,49	2,42±0,58	1,20±0,10	1,34±0,27	0,87±0,11	0,70±0,09	0,44±0,05*	0,61±0,07
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,29±0,06	1,25±0,11	1,31±0,08	1,05±0,08	0,78±0,11	1,01±0,13	0,58±0,18	0,76±0,26

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,77±0,05 kat ve 0,89±0,05 kat azaltmıştır. 28. günde MANF tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,74±0,12 kat artırırken, 55. günde CDNF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 0,38±0,03 kat azaltmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi, 55. günde ise CDNF tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,67±0,05 kat ve 0,35±0,01 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.3.1., $p<0,05$).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi TGF-Beta1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,80±0,49 kat ve 2,42±0,58 kat arttırmıştır. 55. günde CDNF tedavisi TGF-Beta1'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 0,44±0,05 kat azaltmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi TGF-Beta'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,58±0,18 kat ve 0,76±0,26 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.3.2., $p<0,05$).

4.10.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF-A)

Tablo 4.10.4.1 İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi

VEGF-A (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,66±0,09*	0,70±0,07	1,14±0,14	0,76±0,50	1,19±0,04	1,67±0,01*	1,14±0,09	1,10±0,08
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,70±0,07	0,96±0,12	1,15±0,21	1,06±0,08	1,04±0,10	1,28±0,05	1,18±0,02	1,11±0,06

Tablo 4.10.4.2 Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-A'nın gen seviyesindeki analizi

VEGF-A (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,04±0,04	1,73±0,22	1,36±0,71	1,64±0,33	0,89±0,07	1,00±0,10	1,01±0,03	1,05±0,09
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,01±0,11	1,50±0,11	1,40±0,08	1,30±0,02	0,81±0,11	1,32±0,03	1,01±0,06	0,97±0,03

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel ölçüde $0,66\pm0,09$ kat azaltırken, MANF tedavisi ise VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $0,70\pm0,07$ kat azaltmıştır. 28. günde MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde $1,67\pm0,01$ kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla $1,18\pm0,02$ kat ve $1,11\pm0,06$ kat arttırmıştır (Tablo 4.10.4.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla $1,04\pm0,04$ kat ve $1,73\pm0,22$ kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla $1,01\pm0,03$ kat ve $1,05\pm0,09$ kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi VEGF-A'nın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmadan $1,01\pm0,06$ kat arttırırsa da MANF tedavisi $0,97\pm0,03$ kat azaltmıştır (Tablo 4.10.4.2.).

4.10.5. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF-B)

Tablo 4.10.5.1 İpsilateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi

VEGF-B (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,15±0,04	1,22±0,07	1,06±0,07	0,99±0,05	1,17±0,12	2,09±0,13*	1,18±0,09	1,11±0,10
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,20±0,10	1,35±0,05	1,15±0,05	1,23±0,09	0,93±0,07	1,27±0,08	1,16±0,14	1,09±0,06

Tablo 4.10.5.2 Kontralateral striatum ve kortekste VEGF-B'nin gen seviyesindeki analizi

VEGF-B (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,96±0,16	1,16±0,13	1,26±0,04	1,48±0,08*	0,87±0,12	1,02±0,07	1,13±0,18	1,00±0,02
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,05±0,04	0,95±0,05	1,29±0,03	1,35±0,07	0,81±0,03	1,26±0,07	1,21±0,14	1,05±0,14

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem CDFN hem de MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,15±0,04 kat ve 1,22±0,07 kat arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,09±0,13 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,16±0,14 kat ve 1,09±0,06 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.5.1).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDFN tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,96±0,16 kat azaltırken, MANF tedavisi ise 1,16±0,13 kat arttırmıştır. 14. günde MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,48±0,08 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi VEGF-B'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,21±0,14 kat ve 1,05±0,14 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.5.2.).

4.10.6. Matriks Metallopeptidaz 9 (MMP-9)

Tablo 4.10.6.1 İpsilateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi

MMP-9 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,45±0,16*	0,55±0,05*	0,57±0,05	0,49±0,09	1,14±0,06	1,87±0,31*	1,19±0,28	1,44±0,04*
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,54±0,10	0,76±0,12	1,20±0,01	0,90±0,67	1,16±0,18	1,23±0,24	0,90±0,25	1,11±0,23

Tablo 4.10.6.2 Kontralateral striatum ve kortekste MMP9'un gen seviyesindeki analizi

MMP-9 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,12±0,20	1,86±0,12	0,69±0,13	1,20±0,34	1,02±0,29	1,25±0,48	1,12±0,50	1,82±0,98
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,87±0,19	1,67±0,55	0,88±0,41	0,91±0,38	1,25±0,36	2,80±1,20	1,23±0,42	1,97±0,39*

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem CDFN hem de MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 0,45±0,16 kat ve 0,55±0,05 kat azaltmıştır. Hem 28. günde hem de 55. günde MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 1,87±0,31 kat ve 1,44±0,04 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDFN tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,90±0,25 kat azaltırken MANF tedavisi ise 1,11±0,23 kat arttırmıştır. (Tablo 4.10.6.1.)

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda hem CDFN hem de MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 1,12±0,20 kat ve 1,86±0,12 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDFN hem de MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,12±0,50 kat ve 1,82±0,98 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde MANF tedavisi MMP9'un seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,97±0,39 kat arttırmıştır (Tablo. 4.10.6.2., $p<0,05$)

4.10.7. Büyüme ile İlgili Protein 43 (GAP43)

Tablo 4.10.7.1 İpsilateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi

GAP43 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,48±0,07*	1,55±0,06*	1,07±0,18	0,68±0,11	1,31±0,18	2,27±0,26*	1,50±0,40	1,18±0,36
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,51±0,20	1,47±0,11	1,02±0,20	0,64±0,10	1,11±0,03	1,64±0,05*	1,43±0,12	1,22±0,09

Tablo 4.10.7.2 Kontralateral striatum ve kortekste GAP43'ün gen seviyesindeki analizi

GAP43 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,09±0,03	1,09±1,08	0,79±0,10	0,71±0,01	0,82±0,07	1,48±0,23	1,49±0,03*	1,33±0,04
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,99±0,5	0,96±0,04	0,81±0,02	0,75±0,08	0,68±0,04	1,12±0,02	1,49±0,02*	1,11±0,07

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem CDFN hem de MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 1,48±0,07 kat ve 1,55±0,06 kat arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,27±0,26 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,64±0,05 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.7.1., $p<0,05$).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda hem CDFN hem de MANF tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,09±0,03 kat ve 1,09±1,08 kat arttırmıştır. 55. günde CDFN tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,49±0,03 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDFN tedavisi GAP43'ün seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,49±0,02 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.7.2., $p<0,05$).

4.10.8. Siliyer Nörotrofik Faktör (SNF, CNTF)

Tablo 4.10.8.1 İpsilateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi

CNTF (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,73±0,02	0,67±0,10	1,05±0,11	1,22±0,10	1,20±0,29	1,10±0,15	0,38±0,01	0,77±0,07
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,85±0,17	0,70±0,07	1,04±0,03	1,38±0,18	1,09±0,13	0,87±0,07	0,39±0,02*	0,81±0,05

Tablo 4.10.8.2 Kontralateral striatum ve kortekste CNTF'nin gen seviyesindeki analizi

CNTF (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
2,20±0,37*	2,00±0,12*	1,41±0,27	1,14±0,19	1,81±0,06	2,00±0,37*	0,52±0,15	0,73±0,06
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,60±0,08	1,61±0,18	1,18±0,11	1,04±0,10	1,92±0,15*	1,81±0,57	0,47±0,15	0,74±0,15

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,73±0,02 kat ve 0,67±0,10 kat azaltmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,38±0,01 kat ve 0,77±0,07 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 0,39±0,02 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.8.1., p<0,05).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 2,20±0,37 kat ve 2,00±0,12 kat arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,00±0,37 kat arttırmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 28. günde CDNF tedavisi CNTF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,92±0,15 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.8.2., p<0,05).

4.10.9. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BKNF, BDNF)

Tablo 4.10.9.1 İpsilateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi

BDNF (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,39±0,27	0,70±0,03	1,29±0,25	1,87±0,37	0,83±0,05	0,74±0,07	1,15±0,01	1,09±0,05
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,64±0,26	0,81±0,11	1,23±0,08	2,04±0,19*	0,66±0,04	0,58±0,03	1,04±0,25	1,19±0,34

Tablo 4.10.9.2 Kontralateral striatum ve kortekste BDNF'nin gen seviyesindeki analizi

BDNF (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,34±0,29	0,98±0,16	3,14±0,17*	4,38±0,52*	2,54±0,31*	2,51±0,34*	1,01±0,11	0,91±0,05
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,19±0,10	0,89±0,04	2,62±0,27*	4,41±0,57*	2,44±0,22*	2,38±0,23*	1,13±0,26	0,89±0,13

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa 1,39±0,27 kat artırırken, MANF tedavisi ise BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde 0,70±0,03 kat azaltmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,15±0,01 kat ve 1,09±0,05 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,04±0,25 kat ve 1,19±0,34 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.9.1).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa 1,34±0,29 kat artırırken, MANF tedavisi ise BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde 0,98±0,16 kat azaltmıştır. 14. günde ve 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 3,14±0,17 kat ve 4,38±0,52 kat, 28. günde 2,54±0,31 kat ve 2,51±0,34 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde ve 28. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi BDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla 14. günde 2,62±0,27 kat ve 4,41±0,57 kat, 28. günde 2,44±0,22 kat ve 2,38±0,23 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.9.2., $p<0,05$)

4.10.10. Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (SDNF, CDNF)

Tablo 4.10.10.1 İpsilateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi

CDNF (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,97±0,15	0,92±0,53	1,92±1,61	1,81±1,91	1,44±0,52	1,46±0,33	1,10±0,34	0,94±0,26
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,93±0,39	0,90±0,58	1,06±0,15	1,21±0,45	0,81±0,17	0,87±0,06	1,07±0,12	0,77±0,09

Tablo 4.10.10.2 Kontralateral striatum ve kortekste CDNF'nin gen seviyesindeki analizi

CDNF (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,96±0,31	1,01±0,15	1,13±0,33	1,40±0,25	0,64±0,18	0,89±0,31	1,03±0,83	0,81±0,46
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,01±0,13	1,32±0,33	0,81±0,17	1,22±0,13	0,73±0,16	0,96±0,38	0,87±0,26	0,81±0,23

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,97±0,15 kat ve 0,92±0,53 kat azaltmıştır. 55. günde CDNF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,10±0,34 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,94±0,26 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,07±0,12 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,77±0,09 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.10.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,96±0,31 kat azaltırken, MANF tedavisi ise CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde 1,01±0,15 kat arttırmıştır. 55. günde CDNF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,03±0,83 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,81±0,46 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi CDNF'nin seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,87±0,26 kat ve 0,81±0,23 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.10.2.).

4.10.11. Mezensefalik Astrosit-türevli Nörotrofik Faktör (MANF)

Tablo 4.10.11.1 İpsilateral striatum ve kortekste MANF'ın gen seviyesindeki analizi

MANF (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,80±0,04	0,79±0,04	1,10±0,01	1,07±0,01	0,95±0,14	1,01±0,17	0,67±0,03	0,69±0,11
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,96±0,09	0,97±0,04	0,95±0,08	0,92±0,02	0,81±0,06	1,16±0,04	0,69±0,04	0,76±0,07

Tablo 4.10.11.2 Kontralateral striatum ve kortekste MANF'ın gen seviyesindeki analizi

MANF (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,34±0,04	1,29±0,02	1,93±0,26*	1,61±0,15	1,17±0,10	0,96±0,11	0,85±0,10	0,84±0,09
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,21±0,06	1,11±0,03	1,70±0,44	1,51±0,18	0,92±0,10	1,03±0,06	0,99±0,11	0,82±0,05

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,80±0,04 kat ve 0,79±0,04 kat azaltmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,67±0,03 kat ve 0,69±0,11 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,69±0,04 kat ve 0,76±0,07 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.11.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,34±0,04 kat ve 1,29±0,02 kat arttırmıştır. 14. günde CDNF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,93±0,26 kat arttırırken, 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,85±0,10 kat ve 0,84±0,09 kat arttırmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi MANF'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,99±0,11 kat ve 0,82±0,05 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.11.2.).

4.10.12. Nöronal Hücresel Adhezyon Molekülü 1 (Ncam1)

Tablo 4.10.12.1 İpsilateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi

Ncam1 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,84±0,09*	1,47±0,10	1,13±0,06	0,69±0,03	1,32±0,11	2,10±0,35*	1,31±0,01	1,39±0,06
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,85±0,14	17,9±0,17	1,16±0,15	0,72±0,10	1,20±0,14	2,67±0,08*	1,30±0,07	1,43±0,07

Tablo 4.10.12.2 Kontralateral striatum ve kortekste Ncam1'in gen seviyesindeki analizi

Ncam1 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,35±0,10	1,13±0,04	0,96±0,03	0,79±0,02	0,83±0,04	1,04±0,02	1,58±0,23	1,38±0,29
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,29±0,05	1,00±0,02	0,90±0,11	0,82±0,10	0,71±0,03	1,16±0,09	1,61±0,07*	1,32±0,05

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,84±0,09 kat artırırken, MANF tedavisi ise Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,47±0,10 kat arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,10±0,35 kat arttırmıştır (p<0,05). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 28. günde MANF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 2,67±0,08 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.12.1., p<0,05)

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla kat ve kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,58±0,23 kat ve 1,38±0,29 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi Ncam1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,61±0,07 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.12.2., p<0,05).

4.10.13. Efrin A5

Tablo 4.10.13.1 İpsilateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi

Efrin A5 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,76±0,12*	1,04±0,02	1,62±0,20	1,42±0,14	1,12±0,09	1,13±0,04	1,16±0,07	1,08±0,12
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,86±0,21	1,44±0,15	1,78±0,24*	1,31±0,08	0,99±0,02	1,21±0,07	1,17±0,11	1,15±0,15

Tablo 4.10.13.2 Kontralateral striatum ve kortekste Efrin A5'in gen seviyesindeki analizi

Efrin A5 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,23±0,02	1,42±0,08	1,53±0,11	1,45±0,16	1,37±0,04	1,54±0,13	0,71±0,08	0,85±0,09
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,09±0,14	1,18±0,13	1,36±0,08	1,16±0,06	1,30±0,09	1,74±0,06*	0,76±0,13	0,93±0,15

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,76±0,12 kat artırırken, MANF tedavisi ise Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,04±0,02 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,16±0,07 kat ve 1,08±0,12 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 14. günde CDNF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,78±0,24 arttırmıştır. (Tablo 4.10.13.1., p<0,05)

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,23±0,02 kat ve 1,42±0,08 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,71±0,08 kat ve 0,85±0,09 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 28. günde MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,74±0,06 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.13.2., p<0,05).

4.10.14. Efrin B1

Tablo 4.10.14.1 İpsilateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi

Efrin B1 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,81±0,11	0,70±0,03	1,28±0,19	1,13±0,11	1,07±0,19	1,11±0,10	1,07±0,26	0,90±0,25
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,01±0,18	0,75±0,11	1,27±0,17	1,29±0,10	0,95±0,14	1,12±0,08	1,22±0,17	1,01±0,23

Tablo 4.10.14.2 Kontralateral striatum ve kortekste Efrin B1'in gen seviyesindeki analizi

Efrin B1 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,03±0,24	1,18±0,08	1,64±0,20	1,32±0,02	0,80±0,07	0,88±0,07	1,18±0,22	1,01±0,28
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,93±0,05	1,10±0,05	1,38±0,15	1,15±0,11	0,77±0,10	0,87±0,06	1,14±0,16	0,83±0,18

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 0,81±0,11 kat ve 0,70±0,03 kat azaltmıştır. 55. günde CDNF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,07±0,26 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,90±0,25 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,22±0,17 kat ve 1,01±0,23 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.14.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,03±0,24 kat ve 1,18±0,08 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,18±0,22 kat ve 1,01±0,28 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi Efrin B1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,14±0,16 kat artırırken, MANF tedavisi ise 0,83±0,18 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.14.2.).

4.10.15. Versican

Tablo 4.10.15.1 İpsilateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi

Versican (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,09±0,08	1,04±0,07	1,44±0,27	1,63±0,34	1,13±0,15	1,82±0,17*	1,02±0,05	1,05±0,11
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,25±0,02	1,32±0,06	1,25±0,19	1,31±0,37	1,03±0,08	1,17±0,12	1,06±0,19	1,24±0,16

Tablo 4.10.15.2 Kontralateral striatum ve kortekste Versican'ın gen seviyesindeki analizi

Versican (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,61±0,34	1,21±0,19	1,68±0,11	1,30±0,30	0,53±0,07	0,58±0,04	0,75±0,13	0,67±0,13
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,21±0,19	1,57±0,07	1,62±0,08*	1,18±0,15	0,56±0,02*	0,74±0,05	0,56±0,05	0,69±0,11

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,09±0,08 kat ve 1,04±0,07 kat arttırmıştır. 28. günde MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,82±0,17 kat arttırmıştır ($p<0,05$). Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,06±0,19 kat ve 1,24±0,16 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.15.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,61±0,34 kat ve 1,21±0,19 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,75±0,13 kat ve 0,67±0,13 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde CDNF tedavisi Versican'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,62±0,08 kat artırırken, 28. günde CDNF tedavisi 0,56±0,02 kat azaltmıştır (Tablo 4.10.15.2., $p<0,05$).

4.10.16. Nörocan

Tablo 4.10.16.1 İpsilateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi

Nörocan (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,27±0,03	1,17±0,17	1,72±0,19*	1,62±0,25	1,41±0,61	1,21±0,48	1,38±0,29	1,51±0,28
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,32±0,12	1,19±0,05	1,15±0,42	1,21±0,55	1,08±0,04	1,02±0,09	1,20±0,10	1,12±0,13

Tablo 4.10.16.2 Kontralateral striatum ve kortekste Nörocan'ın gen seviyesindeki analizi

Nörocan (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,96±0,02	1,26±0,08	1,94±0,47	1,92±0,48	1,00±0,15	0,90±0,13	1,12±0,03	0,96±0,22
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,02±0,02	1,15±0,12	1,81±0,09*	1,51±0,09	0,56±0,02	0,98±0,13	1,32±0,07	0,90±0,06

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,27±0,03 kat ve 1,17±0,17 kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,38±0,29 kat ve 1,51±0,28 kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 1,20±0,10 kat ve 1,12±0,13 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.16.1.).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 0,96±0,02 kat azaltırken, MANF tedavisi ise Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,26±0,08 kat arttırmıştır. 55. günde CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,12±0,03 kat artırırken, MANF tedavisi 0,96±0,22 kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 14. günde CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde 1,81±0,09 kat arttırmıştır (Tablo 4.10.16.2., p<0,05).

4.10.17. Netrin-1

Tablo 4.10.17.1 İpsilateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi

Netrin-1 (Kat değişimi)							
İpsilateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
0,93±0,03	1,24±0,04	0,95±0,02	0,76±0,02	1,12±0,02	1,51±0,06	0,89±0,16	0,95±0,14
İpsilateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,15±0,02	1,65±0,01	0,94±0,31	0,80±0,18	0,99±0,18	1,34±0,15	0,93±0,09	1,04±0,08

Tablo 4.10.17.2 Kontralateral striatum ve kortekste Netrin-1'in gen seviyesindeki analizi

Netrin-1 (Kat değişimi)							
Kontralateral Striatum							
3. gün		14. gün		28. gün		55. gün	
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,50±0,08	0,84±0,01	0,86±0,17	0,79±0,11	0,76±0,11	0,68±0,03	2,41±0,25*	1,48±0,13
Kontralateral Korteks							
CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF	CDNF	MANF
1,14±0,05	0,69±0,03	0,83±0,09	0,70±0,10	0,58±0,03	0,88±0,07	2,07±0,12*	1,69±0,08*

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi Netrin-1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $0,93 \pm 0,03$ kat azaltırken, MANF tedavisi ise Netrin-1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $1,24 \pm 0,04$ kat arttırmıştır. 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla $0,89 \pm 0,16$ kat ve $0,95 \pm 0,14$ kat azaltmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında ipsilateral kortekste 55. günde CDNF tedavisi Nörocen'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $0,93 \pm 0,09$ kat azaltırken, MANF tedavisi $1,04 \pm 0,08$ kat arttırmıştır (Tablo 4.10.17.1).

Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral striatumda 3. günde CDNF tedavisi Netrin1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde $1,50 \pm 0,08$ kat artırırken, MANF tedavisi Netrin1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $0,84 \pm 0,01$ kat azaltmıştır. 55. günde CDNF tedavisi Netrin1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde $2,41 \pm 0,25$ kat, MANF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da $1,48 \pm 0,13$ kat arttırmıştır. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında kontralateral kortekste 55. günde hem CDNF hem de MANF tedavisi Ntn1'in seviyesini gen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sırasıyla $2,07 \pm 0,12$ kat ve $1,69 \pm 0,08$ kat arttırmıştır (Tablo 4.10.17.2.).

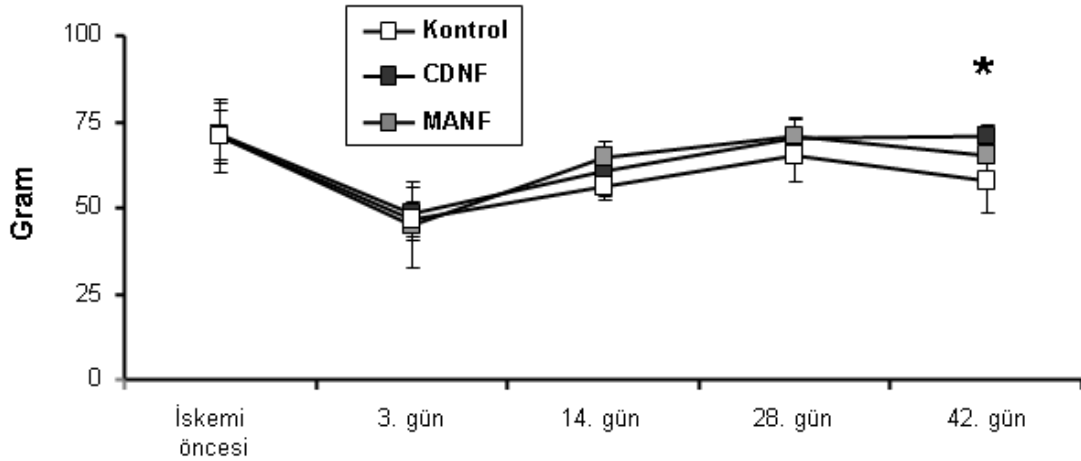
4.11. Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili davranış testleri

4.11.1. İskemi sonrası davranış testlerinin değerlendirilmesi

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

4.11.2. El çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi

El Çekme/Kavrama Gücü (Grip Strength Testi)

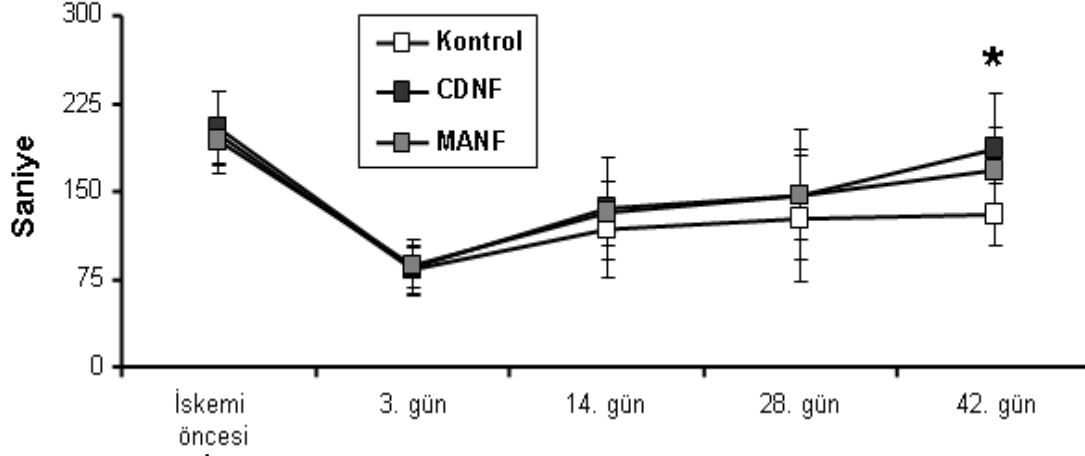


Şekil 4.11.2.1. İskemi sonrası el çekme/kavrama gücünün değerlendirilmesi.

Farelerin beyin felci sonrasındaki çekme/kavrama gücündeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla el çekme gücü testi yapılmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.11.2.1., $F(2,15)=20,756$ $p<0,01$, 42. günde $p=0,14$).

4.11.3. RotaRot ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi

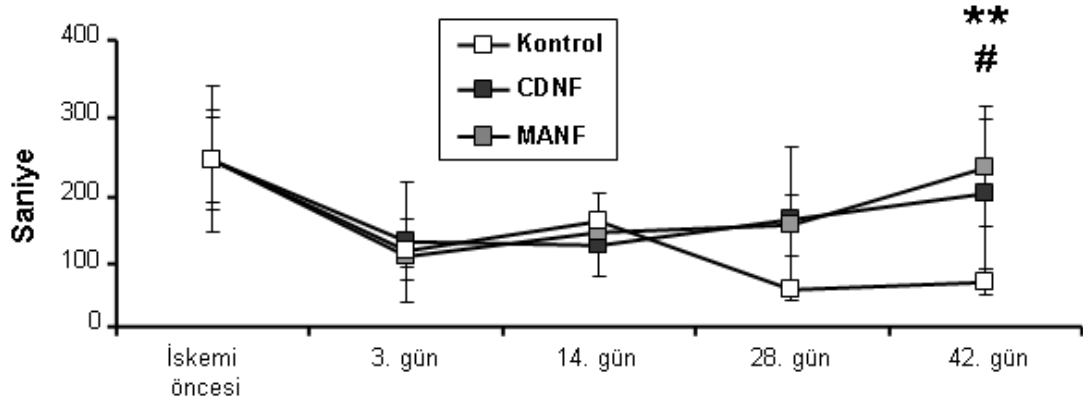
Motor Koordinasyon (Rota-Rod Testi)



Şekil 4.11.3.1. İskemi sonrası motor koordinasyonun değerlendirilmesi.

Farelerin beyin felci sonrasındaki motor koordinasyonlarındaki değişimlerinin belirlenmesi amacıyla rotarod testi yapılmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesine göre kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre CDFN tedavisi motor koordinasyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmıştır (Şekil 4.11.3.1., $F(2,14)=1,111$ $p=0,357$, 42. günde $p=0,012$).

4.11.4. Yükseltilmiş O-labirenti ile anksiyetenin değerlendirilmesi Açık Alanda Geçirilen Süre (Yüksektilmiş O-Labirenti Testi)

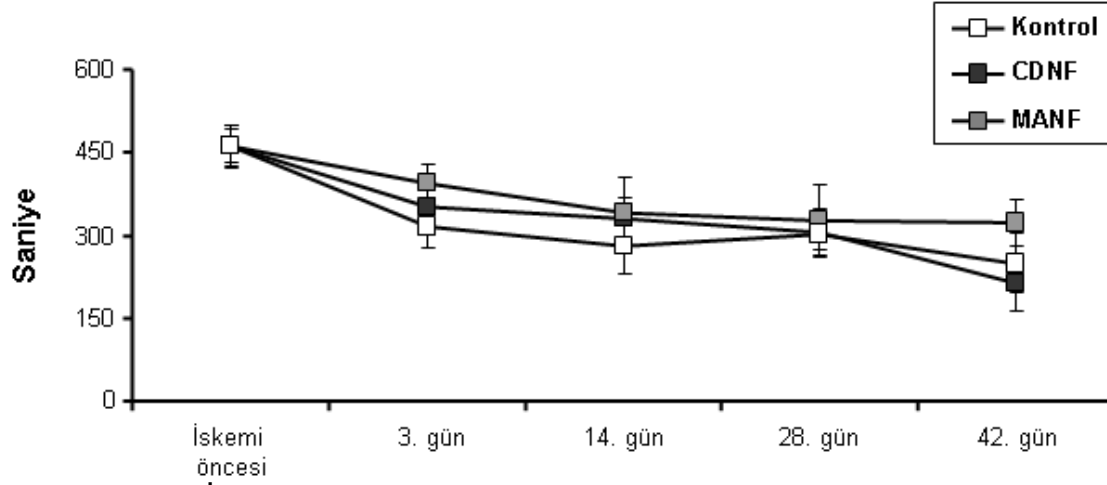


Şekil 4.11.4.1. İskemi sonrası anksiyetenin değerlendirilmesi.

İskemi sonrası motor davranışı ve anksiyeteyi ölçmek için yükseltilmiş o-labirenti testi yapılmıştır. Bu testte farelerin açık alanda geçirdikleri süre hesaplanmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF tedavisi hem de MANF tedavisi endişe ve korkuyu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 4.11.4.1.).

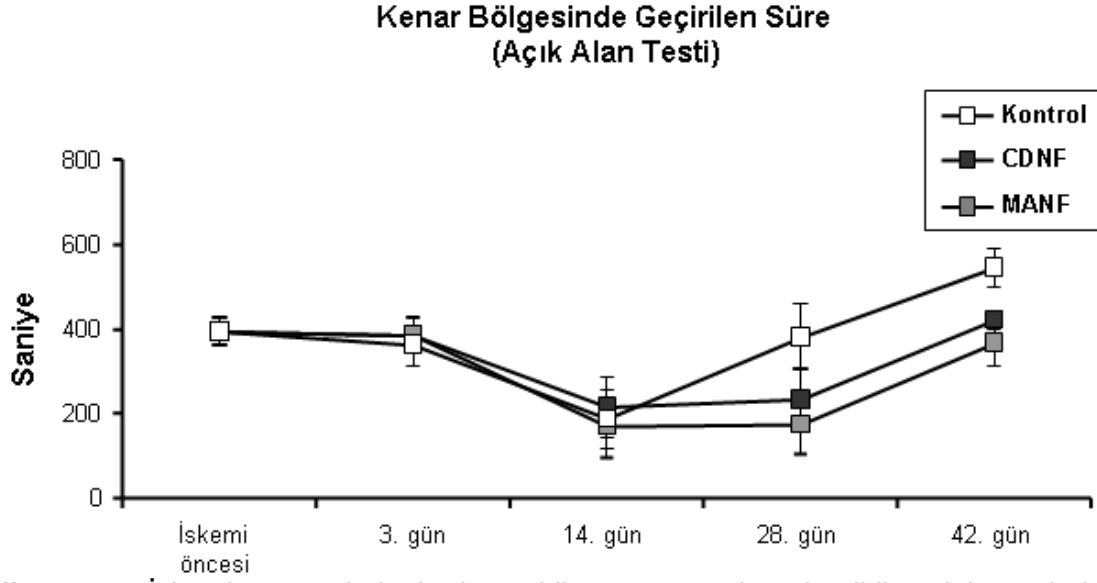
4.11.5. Açık alan testi ile motor aktivitelerin değerlendirilmesi

Hareketlilik Süresi (Açık Alan Testi)



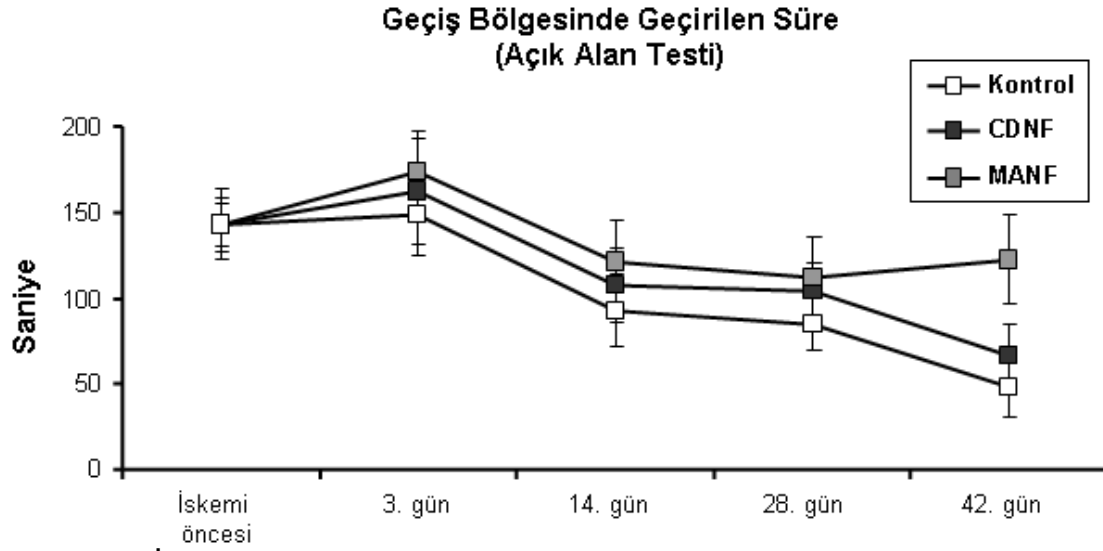
Şekil 4.11.5.1. İskemi sonrası hareketlilik süresinin değerlendirilmesi.

İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin hareketli kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre MANF tedavisinde hayvanların hareketli kaldıkları süre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmıştır (Şekil 4.11.5.1.).



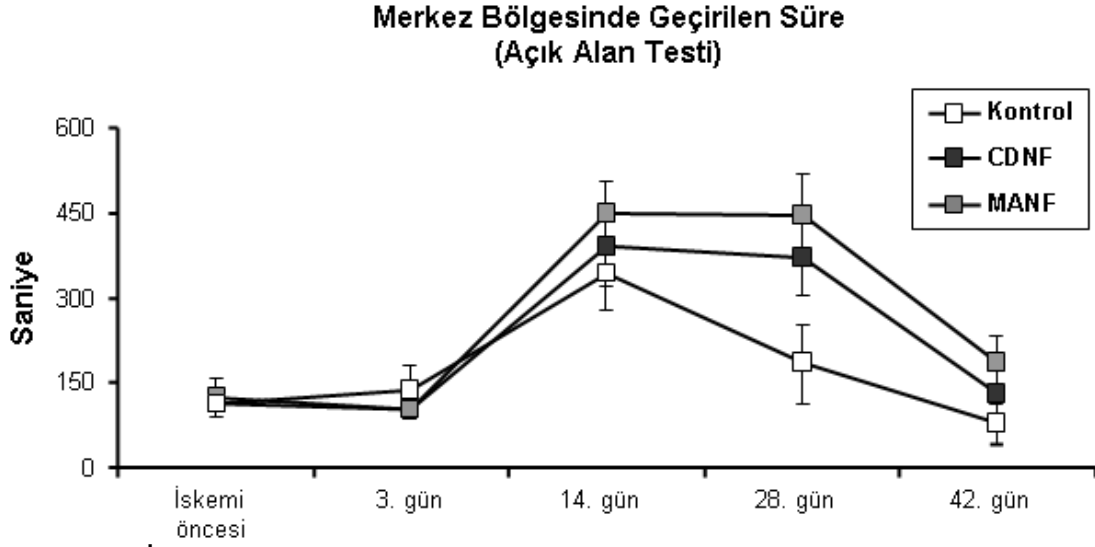
Şekil 4.11.5.2. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; kenar bölgesi.

İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (**kenar**, geçiş, merkez) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF hem de MANF tedavisi hayvanların kenar bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştır (Şekil 4.11.5.2.).



Şekil 4.11.5.3. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; geçiş bölgesi.

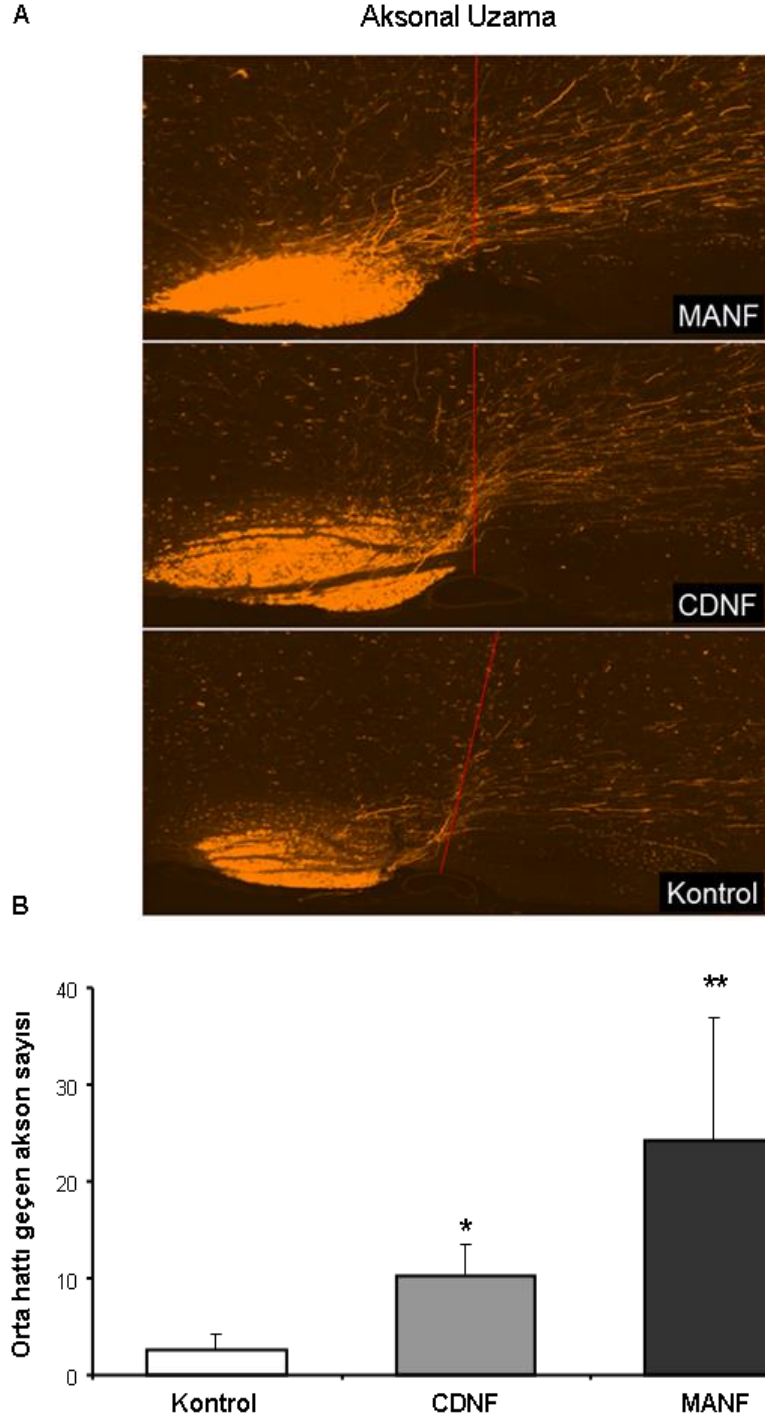
İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (kenar, **geçiş**, merkez) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF hem de MANF tedavisi hayvanların geçiş bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 4.11.5.3.).



Şekil 4.11.5.4. İskemi sonrası bölgelerde geçirilen zamanın değerlendirilmesi; merkez bölge.

İskemi sonrası lokomotor aktiviteyi ve anksiyeteyi ölçmek için açık alan testi kullanılmıştır. Bu testte farelerin farklı (kenar, geçiş, **merkez**) alanlarda kaldıkları süreler hesaplanmıştır. 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan testlerin sonucu operasyon öncesiyle kıyaslandığında, 42. günde kontrol grubuna göre hem CDNF hem de MANF tedavisi hayvanların merkez bölgesinde kaldıkları süreyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır (Şekil 4.11.5.4.).

4.12. Aksonal uzamanın değerlendirilmesi



Şekil 4.12.1. Fasiyel nükleus seviyesindeki aksonal uzamanın değerlendirilmesi.

İskemi sonrası kortikobulbar projeksiyonların değerlendirilmesi fasiyel nükleus seviyesinden yapılmıştır (Bregma –5,8 ile –6,3 mm arası). İki hemisfer arasındaki orta hatta çizilen 1000 μm 'lik sanal çizgiyi (Şekil 6.10.1. kırmızı ile gösterilen çizgi) geçen aksonların sayılması sonucu, aksonal uzamayı hem CDNF hem de MANF tedavisinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.12.1., CDNF $p=0,021$, MANF $p=0,001$).

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

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

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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

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

Operasyonların tekrar edilebilirliğini ve iskeminin 30 dakika ile sınırlandırılmasının kontrolü için hayvanların beyin kan akımları LDF ile kontrol edilmiştir. Her ne kadar LDF ile kesin ve mutlak bir bölgesel kanlanma ölçümü yapılamasa da bu metotta non-invazif ve sürekli olarak beyindeki küçük bir bölgenin kan akımındaki anlık değişimler takip edilebilmektedir (Doepfner vd., 2017; Kilic vd., 2014). Yapılan tüm setlerde (3 gün, 14 gün, 28 gün, 55 gün ve davranış setleri) serebral kanlanma operasyon öncesine göre yaklaşık % 80'lik bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.1.1.). 30 dakika iskemi sonrasında ise tüm gruplarda operasyon öncesi değere göre reperfüzyon aşamasında kan akımı tekrar yaklaşık % 100 seviyelerine çıkmıştır (Şekil 4.1.1.). Reperfüzyon aşamasındaki kanlanma değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark görülmemiştir. Bu sonucu değerlendirirken tedavilerin 3. günde başladığı, reperfüzyon aşamasında gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmadığı göz önüne alınmalıdır. Kanlanmada herhangi bir değişiklik beklenmemekle birlikte tedavi aşamasına geldiğinde (3. günde) hayvanlarda hasarın oluşturulma şekli ile ilgili deneysel bir fark bulunmadığı düşünülmektedir. Böylece farklı günlerde yapılan hasarla ilgili yapılan analizlerde bulunan sonuçların tedavi kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

OSA tıkanmasına bağılı olarak striatumda yavaş ilerleyen sekonder hasar oluşmakta ve bunun sonucunda apoptotik hücre ölümü görülmektedir (Beker vd., 2015; Kilic vd., 2014). Apoptotik hücre ölümünü değerlendirebilmek için in situ hücre ölüm kiti kullanılmıştır. Apoptotik hücre ölümünün son aşaması olan DNA kırıklarının oluşmasını ölçen kit sayesinde apoptotik hücre sayısındaki zamana bağılı ve gruplar arasında değişiklikler incelenebilmiştir. Zamana ve hasarın etkisine bağılı olarak beklenen şekilde apoptotik hücre sayısı herhangi bir tedavinin olmadığı kontrol grubunda da düşmüştür (Şekil 4.2.1.). Özellikle 14. günde CDNF tedavisi ve 28. günde ise hem CDNF hem de MANF tedavisi apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürmüştür. 55. günde ise gruplar arasında herhangi fark görülmemiştir. 14. günde yapılan değerlendirme sonucunda tedavilerin apoptotik hücre ölümünü azaltmasıyla birlikte bundan sorumlu hücre içi sinyal mekanizmasını anlamak için gen ve protein seviyesinde analizler yapılmıştır.

Ratlarda yapılan bir çalışmada OSA tıkanması sonrası, yaklaşık 30 gün sonra ipsilateral striatum ve korteks bölgelerinde atrofi görülmüştür (Hara vd., 1993). Benzer şekilde farelerde 30 dakikalık OSA tıkanması sonucunda uzun dönemde striatumda atrofi görülmüştür (Katchanov vd., 2003; Pedrono vd., 2010). Uzun dönemde oluşan atrofının değerlendirilebilmesi için 55. gün kesitlerine *cresyl violet* boyaması yapılmıştır (Kilic vd., 2014; Reitmeir vd., 2011). Bu boyama ile sadece nöronlar boyanabildiği için kesit üzerindeki hemisfer, korteks, striatum ve korpus kallozum alanlarının ölçülebilmesine imkan vermektedir. Korpus kallozum ve striatumdaki atrofiyi değerlendirebilmek için hasarsız hemisferdeki korpus kallozum ve striatum alanları ölçülmüş ve bu değerlerden, hasarlı hemisferdeki korpus kallozum ve striatum alanları çıkarılmıştır. Elde edilen bu fark atrofi alanı olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CDNF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde atrofi alanını hem korpus kallozumda hem de striatumda düşürmüştür (Şekil 4.3.1.). Bu sonuçla apoptotik hücre ölümü birlikte değerlendirildiğinde ölen hücre sayısının azalmasıyla birlikte dokudaki hücre kaybının ve dolayısıyla atrofının azaldığı düşünülmektedir.

BrdU immünoboyaması ile birlikte astrositler için GFAP, mikroglia için Iba-1, yeni oluşan nöronlar için DCX ve olgun nöronlar için NeuN çift immünoboyaması da yapılabileceği için iskemi sonrası hücresel proliferasyon profilinin gösterilmesi için bu BrdU enjeksiyonu ve sonrası BrdU'nun immüno Floresan olarak boyanması literatürde kullanılmaktadır (Doepfner vd., 2017; Li vd., 2014). Hasarla ilgili mekanizmalarla ilgili olarak CDNF veya MANF tedavilerinin nörojeniz ve gliogenez üzerine olan etkilerini ölçebilmek için, hasarının oluşturulmasından üç gün sonra başlamak üzere, üçer gün aralıklarla 100 mg/kg dozunda - DNA'nın yapısına katılan ve bölünen hücre işaretçisi olarak kullanılan- BrdU intraperitoneal olarak verilmiştir. 55 günün sonunda farelere yüksek doz anestezi altında serum fizyolojik ile

perfüzyon ve % 4'lük PFA ile fiksasyon yapılmıştır. Daha sonra yeni oluşan nöronları gösterebilmek için Brdu/NeuN çift boyaması, yeni oluşan gliaları gösterebilmek için BrdU/GFAP çift boyaması yapılmış ve her iki immünoboyamada da pozitif veren hücre sayısı değerlendirilmiştir. Gruplar arası değerlendirme yapıldığında uzun dönemde kontrol grubuyla kıyaslandığında CDNF tedavisi yeni oluşan nöron sayısını istatistiksel olarak arttırmıştır (Şekil 4.4.1.). Tedaviyle birlikte herhangi bir kök hücre tedavisi yapılmadığından ve nöronların bölünmediği düşüldüğünden, CDNF tedavisini endojen olarak özellikle ventrikül altındaki bölgede bulunan kök hücrelerin farklılaşmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

İskemiden 6 gün sonra glial yaranın oluşmaya başladığı, GFAP+ hücrelerin iske mi sonrası ilk 6 günde morfolojilerini değiştirerek iskemik hat boyunca hasarın sınırına göç ederek yoğun bir şekilde toplandıkları ve hasarı sınırlandırmaya çalıştıkları bilinmektedir (Li vd., 2014). Uzun dönemde yapılan değerlendirme sonucunda reaktif astroglia olduğu düşünülen hücre sayısı her iki tedavi sonucunda da artmıştır. (Şekil 4.5.1.) Gliaların hasar üzerindeki rolleri arasında hem hasarı onarmadaki görevleri hem de aksonal uzamayı engelleyici görevleri bilinmektedir. Bu artışın glial yara oluşumu ile birlikte aksonal uzamayı etkileyip etkilemediğine bakmak için GFAP boyanan kesitlerde aynı zamanda yara alanı da değerlendirilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CDNF tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde oluşan yara alanını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.8.1.).

Yapılan tedavilerin hücre içi sinyal mekanizmalarına olan etkisinin görülebilmesi için *Western Blot* yöntemi ile protein miktar analizi yapılmıştır. Hem zamana bağlı hem de gruplar arasındaki farklılıkların görülmesi amacıyla, protein ekspresyon çalışmaları için iskemiden 14, 28 ve 55 gün sonra sakrifiye edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları kullanılmıştır. Hücre içinde ölüm ve hayatta kalımla ilgili Akt (Şekil 4.9.1.1), p44/-42 (Şekil 4.9.2.1.), p38 (Şekil 4.9.3.1.), pJNK (Şekil 4.9.4.1.), p21 (Şekil 4.9.5.1.), eNOS (Şekil 4.9.6.1.), iNOS (Şekil 4.9.7.1.), nNOS (Şekil 4.9.8.1.), plastisitede rol oynayan Versican (Şekil 4.9.9.1.), Brevican (Şekil 4.9.10.1.), Efrin B1 (Şekil 4.9.11.1.) ve Efrin B2 (Şekil 4.9.12.1.) gibi protein seviyelerindeki değişikliklerin zamana bağlı analizi yapılmıştır. Fosfoinositit 3-kinaz ve fosfoinositit-bağımlı protein kinaz tarafından fosforlanan Akt'nin aktifleşmesinin apoptozu blokladığı düşünülmektedir (Franke vd., 2003; Hanada vd., 2004). AKT'nin fonksiyonunun *Wortmannin* veya *LY294002* gibi kimyasallarla inhibe edilmesi sonucu iskemik hasarın arttığı bilinmektedir (Gao vd., 2008; Hao vd., 2017). Her ne kadar Akt'nin forforlanması aktifleştiği gösterse de forforlanma miktarı tam olarak aktiviteyi yansıtmamaktadır (Zhao vd., 2005). p44/-42 olarak da bilinen Erk1/2'nin ise iske mi sonrası protektif rolü (Shamloo vd., 1999) olduğu kadar hasarı arttırdığı da gösterilmiştir (Noshita vd., 2002; Wang vd., 2004b). Genel olarak Erk1/2'nin hücre sel farklılaşmada, hücre

proliferasyonunda ve apoptozun regülasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Shen vd., 2004). Literatürde Erk1/2 için bulunan bu farklı rollerin, kullanılan iskemik modellerden ve iskemiden etkilenen hücre tipleriyle birlikte etkilenen bölgelerin farklılıklarından olduğu düşünülmektedir. Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında MANF tedavisinin iskemik striatumda fosfo-Akt ve fosfo p44/-42 seviyesini azalttığı görülmüştür. p38 proteininin stres, bakteriyel lipopolisakkaritler ve IL1 ve TNF gibi sitokinler tarafından aktive olarak, hücreyi ölüme götürdüğü bilinmektedir (Oppenheim, 1991). Etkileyen ve etkilenen sinyal yolları tam olarak bilinmese de p38'in aktivasyonunun nöronları apoptoza götürdüğü ve inhibisyonun ise nöronal sağkalımı arttırdığı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Horstmann vd., 1998; Skaper vd., 1998). *Cyclin-dependent* kinaz (CDK) inhibitör olan p21 proteini, hücre döngüsü üzerine etki ederek nöronal kök hücre popülasyonunu kısıtladığı *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sebeple p21'in iskemi sonrası nöronal rejenerasyonu engellediği düşünülmektedir (Qiu vd., 2004). Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında hem CDNF hem de MANF tedavileri fosfo-p38 ve p21 seviyesini azalttığı görülmüştür. Nitrik oksit (NO) hem beyinde hem de periferel sinir sisteminde vaküler homeostasis ve kan akımının düzenleyici olduğu bilinmektedir. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz'ın (eNOS) inhibe edilmesinin serebral kanlanmayı azalttığı ve buna bağlı olarak dokudaki hasarı arttırdığı gösterilmiştir. eNOS'un seviyesinin hasar sonrası enfarktüs alanında arttığı bilinmesine rağmen, bunun etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Huang vd., 1994). Endotelden salınan NO'nun damarlardaki platelet oluşumunu ve lökosit infiltrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kubes vd., 1992). Fosforlanmış eNOS'tan NO üretiminin ise iskemi sonrası bölgesel kan akımını arttırabileceği düşünülmektedir. Sitokinlerle alakalı bir çok uyarının glial hücreleri uyarak, Ca^{+2} bağımsız indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdıkları ve artan iNOS'un NO salınımını aşırı derecede arttırarak komşu nöronlara hasar verdiği bilinmektedir (Bolanos vd., 1996). İskemi sonrası glial hücrelerde iNOS ekspresyonunun arttığı bilindiği gibi, bunun inhibe edilmesinin de iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (Iadecola vd., 1995; Zhang vd., 1996). Uzun dönemde yapılan protein analizinde kendi kontrolüyle kıyaslandığında MANF tedavisi eNOS seviyesini arttırırken, hem CDNF hem de MANF tedavisi iNOS seviyesini azalttığı görülmüştür.

Yapılan tedavilerin gen ekspresyon mekanizmalarına olan etkisinin görülebilmesi için qPCR yöntemi ile gen miktar analizi yapılmıştır. Hem zamana hem de gruplar arasındaki farklılıkların görülmesi amacıyla, gen ekspresyon çalışmaları için iskemiden 3, 14, 28 ve 55 gün sonra kurban edilen farelerin iskemik ve iskemik olmayan striatumları ve korteksleri kullanılmıştır. Anti-enflamatuvar etkili genler (IL1 β , TNF α , TGF β), damarlaşma ile ilgili genler (VEGF-B, VEGF-A, MMP-9), plastisiteyi uyaran ve hücre yaşamını etkileyen genler (GAP43,

CNTF, BDNF, CDNF, MANF) ve plastisiteyi etkileyen genler (Ncam1, Efrin A5, Efrin B1, Versican, Nörocan, Netrin-1) olmak üzere toplam 17 gendeki değişiklikler incelenmiştir.

İskemi sonrası artan IL-1 β , TNF- α ve TGF- β gibi sitokin üretimi olduğu bilinmektedir (Liu vd., 1994b). Bunlar içerisinde IL-1 β 'in iskemik, ekzitotoksik ve travmatik beyin hasarını arttırdığı, muhtemelen glia ve nöronlar üzerinde olduğu gibi vasküler hücreler üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir (Allan vd., 2001). TNF- α 'nın ise hasar üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkisi olduğu düşünülmektedir. İskemi sonrası adenoviral vektör ile TGF- β 'nın aşırı ekspres edilmesinin nöroprotektif rolü olduğu düşünülmektedir (Pang vd., 2001). Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi IL-1Beta ve TNF alfa seviyesini azaltmıştır (Tablo 4.10.1.1. ve 4.10.2.2) Benzer şekilde TGF-Beta1'in kontralateral striatum ve korteksteki seviyesi de CDNF tedavisi ve MANF tedavisi ile azalırken, ipsilateralde ise TGF-Beta1'in her iki bölgedeki seviyesi de artmıştır (Tablo 4.10.3.1 ve 4.10.3.2).

MMP'lerin hücrelerarasındaki maddenin degradasyonunda görev alan enzimler olduğu bilinmekte ve merkezi sinir sisteminde hem fizyolojik hem de patofizyolojik şartlarda farklı görevleri olduğu düşünülmektedir. İskemi sonrası MMP9'un seviyesinin arttığı ve bulunun da kan beyin bariyeri geçirgenliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lucivero vd., 2007). Literatürde yapılan bir çalışmada MMP9'un seviyesinin iskemiden 24 saat sonra en yüksek seviyeye çıktığı gösterilmiştir (Montaner vd., 2001). VEGF'lerin iskemi sonrası vasküler regülasyonda önemli görevleri olduğu ve iskemi sonrası protein ekspresyonundaki artış bilinmektedir (Hayashi vd., 1997; Kovacs vd., 1996). Her ne kadar akut hasarın tamamlanmasından sonra verildiğinde koruyucu etki görülse de akut dönemde VEGF tedavisinin kan beyin bariyeri geçirgenliğini bozduğu ve iskemik hasarı arttırdığı bilinmektedir (Liu vd., 1994a; Sbarbati vd., 1996). Hipoksi ve enflamasyon sonrası artan VEGF-A ekspresyonun düz kas hücrelerini uyararak ve göç etmelerini sağlayarak yeni damar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (Hiyama vd., 2010). VEGF-A ekspres eden adenoviral vektörün iskemik hasardan üç gün sonra verilmesi sonucu nörolojik olarak iyi sonuçlar alınırken, hasarın da azaldığı görülmüştür (Zheng vd., 2010). VEGF-B'nin ise endotelial hücrelerin yağ asidi alımını regüle ettiği düşünülmektedir (Hiyama vd., 2010). VEGF-B ekspres etmeyen farelerde yapılan OSA oklüzyonu sonunda ise enfarktüs hacminin kontrole göre % 40 daha fazla olduğu ve nörolojik fonksiyonda bozulmalar görülmüştür (Sun vd., 2004). Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi damarlaşma ile ilgili önemli bir büyüme faktörü olan VEGF A seviyesini (Tablo 4.10.4.1. ve 4.10.4.2.) ve VEGF B seviyesini (Tablo 4.10.5.1. ve 4.10.5.2.) arttırırken bu artış bir tek kontralateral kortekste MANF tedavisi ile görülmemiştir. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF

tedavisi MMP9 (Tablo 4.10.6.1 ve 4.10.6.2.) arttırken bu artış bir tek ipsilateral kortekste CDNF tedavisi ile görülmemiştir.

Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan GAP43'ün seviyesini (Tablo 4.10.7.1. ve 4.10.7.2.) arttırmıştır. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan CNTF'nin seviyesini (Tablo 4.10.8.1. ve 4.10.8.2.) azaltmıştır. Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan BDNF'nin seviyesini (Tablo 4.10.9.1 ve 4.10.9.2.) azaltmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi BDNF'nin seviyesini arttırken, MANF tedavisi ise düşürmüştür. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan CDNF'nin seviyesini (Tablo 4.10.10.1 ve 4.10.10.2.) azaltırken, CDNF tedavisi, ipsilateral striatum ve kortekste, kontralateralde ise sadece striatumda arttırmıştır. Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi hücre büyümesini pozitif yönde etkileyen bir protein olan MANF'ın seviyesini (Tablo 4.10.11.1. ve 4.10.11.2.) azaltmıştır.

Uzun dönemde hem ipsilateral hem de kontralateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi plastisiteyi pozitif yönde etkileyen bir protein olan Ncam1'in seviyesini (Tablo 4.10.12.1. ve 4.10.12.2.) arttırmıştır. Plastisitenin düzenlenmesinde morfolojik olarak görev alan bu protein hem sinapsın yapısının korunmasını hem de yeni sinapslar oluşturacak mekanizmalarda görev aldığı düşünülmektedir (Doherty vd., 1995). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste CDNF tedavisi ve MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Efrin A5'in seviyesini (Tablo 4.10.13.1.) arttırmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste ise CDNF tedavisi ve MANF tedavisi Efrin A5'in seviyesini azaltmıştır (Tablo 4.10.13.2.). Uzun dönemde ipsilateral kortekste ve kontralateral striatumda hem CDNF hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı regüle eden bir protein olan Efrin B1'in seviyesini arttırmıştır (Tablo 4.10.14.1. ve 4.10.14.2.). İpsilateral striatumda ve kontralateral kortekste CDNF tedavisi Efrin B1'in seviyesini arttırken, MANF tedavisi ise azaltmıştır (Tablo 4.10.14.1. ve 4.10.14.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDNF hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Versican'ın seviyesini arttırmıştır (Tablo 4.10.15.1.). Kontralateral striatum ve kortekste ise hem CDNF hem de MANF tedavisi Versican'ın seviyesini azaltmıştır (Tablo 4.10.15.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDNF hem de MANF tedavisi plastisiteyi ve aksonal uzamayı inhibe eden bir protein olan Nörocane'nin seviyesini arttırmıştır (Tablo 4.10.16.1.). Kontralateralde ise hem striatum hem de kortekste

CDNF tedavisi Nörocan'ın seviyesini artırırken, MANF tedavisi ise düşürmüştür (Tablo 4.10.16.2.). Uzun dönemde ipsilateral striatum ve kortekste hem CDFN hem de MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini azaltmıştır (Tablo 4.10.17.1.). Bundan farklı olarak sadece ipsilateral kortekste MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini azaltmamış, arttırmıştır. Kontralateral striatum ve kortekste ise hem CDFN hem de MANF tedavisi Netrin-1'in seviyesini arttırmıştır. (Tablo 4.10.17.2.).

Reaktif astrositlerin anterograd dejenerasyonda hasar sonrası ortamdaki hücre kalıntılarının fagositozla temizlenmesi gibi önemli görevleri bilinmektedir. Bu temizlik olmaksızın yeni akson uzamasını mümkün değildir. Ancak bu temizlik sırasında astrositler tarafından ekspres edilen bazı proteinlerin de aksonal uzamayı inhibe ettiği bilinmektedir (Bechmann vd., 1997; Deller, 1998; Matthews vd., 1976). Efrin B1 ve Efrin B reseptörlerinin reaktif astrositlerde yüksek miktarda ekspres edildiği ve bu miktarın hasardan 30 gün sonra bile hala yüksek olduğu daha önce gösterilmiştir (Wang vd., 2005). Bu mekanizmaların dışında reaktif astrositlerin oluşturduğu glial yara nedeniyle iskemi sonrası yeni akson oluşumunun ve filizlenmesinin (*sprouting*) inhibe edildiği bilinmektedir. Bu mekanizma içerisinde kondroitin sulfate proteoglikanlarının bulunduğu daha önce gösterilmiştir (Overman vd., 2012). Bunlar içerisinde olan Efrin A5'in seviyesinin bloklanması aksonal plastisite için önem kazanmaktadır. Benzer şekilde glial yara içerisinde hem reaktif astrositlerin miktarının arttığı hem de akson uzamasını inhibe eden Nörocan (Asher vd., 2000; Haas vd., 1999; McKeon vd., 1991) ve Versican (Asher vd., 2002; Jones vd., 2003; Tang vd., 2003) gibi proteinleri arttırdığı gösterilmiştir. İskemi sonrası iskemiye kontralateral korteksten iskemik korteks, beyin kökü ve omurilikteki bölgelere doğru yeni aksonlar uzadığı bilinmektedir (Chen vd., 2002; Seymour vd., 2005; Wang vd., 2004a). Endojen olarak gerçekleşen bu mekanizmanın sonucunda da fonksiyonel geri kazanımın etkilendiği ve bir şekilde plastisiteyi etkileyen proteinlerin de fonksiyonel geri kazanım için önemli olduğu düşünülmektedir. Akson uzamasını engelleyen proteinlerin inhibe edilmesi sonucu fonksiyonel geri kazanımda; motor koordinasyonun ve el çekme gücünün düzelmesinde ve anksiyetinin azalmasında pozitif sonuçlar alınacağı hipotize edilmiştir (Overman vd., 2012). Merkezi sinir sisteminin gelişimsel evresinde netrin ailesine ait proteinlerin hücre göçünde ve aksonların hedeflerini bulmasında görev aldıkları bilinmektedir (Cook vd., 1998; Tessier-Lavigne vd., 1996). Bununla birlikte hem fizyolojik şartlarda hem de patofizyolojik şartlarda netrin ekspresyonu olduğu ve netrinlerin böbrek iskemisinde, myokardiyal enfarktüste ve apoptoz önlemedeki koruyucu görevleri bilinmektedir (Reeves vd., 2008; Wu vd., 2008). Ayrıca ratlarda yapılan bir çalışmada, tüm beyni etkileyen global iskemi sonrası hipokampüse netrin-1 enjekte edildiğinde hafızadaki bozulmayı ve sinaptik düzensizlikleri giderdiği gösterilmiştir (Bayat vd., 2012).

Fonksiyonel nörolojik iyileşme operasyondan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan el çekme/kavrama gücü, rotarod motor koordinasyon, yükseltilmiş O-labirenti ve açık alan testleri ile değerlendirilmiştir. İlk davranış testleri beyin felcinden önce taban çizgi (*baseline*) oluşturması amacıyla yapılmıştır. İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ölçülebilmesi ve sağ ön tek pençenin kavrama gücünü ölçmek için el çekme/kavrama gücü testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.2.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. Uzun dönemdeki iyileşme incelendiğinde 42. günde CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.11.2.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve motor koordinasyonun ölçülebilmesi için rotarod testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.3.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. Uzun dönemdeki iyileşme incelendiğinde 42. günde CDNF tedavisi el çekme gücünü istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.11.3.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve anksiyete ve korkuyu ölçmek için el yükseltilmiş o-labirenti testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.4.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. İskeminin etkilediği bölgeden kaynaklı hasar sonrası *in vivo* iskemik hayvanlarda ve klinikte hastalarda görülen anksiyete benzeri davranış; bu teste kapalı alanda geçirilen süre olarak yansımaktadır. Şekilde görüldüğü üzere iskemi öncesi hayvanlar açık alanda zaman geçirirken, iskemik hasarın en çok görüldüğü 3. günde açık alanda zaman geçirmeyi tercih etmemişlerdir. Bu durum zamanla herhangi bir tedavi olmasa da düzelse de uzun dönemde hem CDNF hem de MANF tedavileri açık alanda geçirilen süreyi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırarak, oluşan anksiyete ve korkuyu azaltmıştır (Şekil 4.11.4.1.). İskemi sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve spontan motor aktivitelerin ve araştırma benzeri davranışların ölçülebilmesi için açık alan testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.5.1.). İskemi sonrası 3. günde yapılan testteki değerler iskemi öncesiyle kıyaslandığında hesaplanan düşüşün iskemi kaynaklı olduğu ve iskemik hasarın tekrar edilebilir şekilde tüm gruplar için benzer şekilde oluşturulduğunun göstergesidir. İskeminin etkilediği bölgeden kaynaklı hasar sonrası *in vivo* iskemik hayvanlarda ve klinikte hastalarda görülen spontan hareketliliğin azalması; bu teste hareketli kalınan süre olarak ölçülebilmektedir. İskemi öncesiyle kıyaslandığında, iskemi

sonrası hareketlilik süresi düşmekte ve bu düşüş zamanla düzelmektedir. Uzun dönemde MANF tedavisi bu düşüşü istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştır (Şekil 4.11.5.1.). Yine bu testle belirlenebilen hayvanların kenar (Şekil 4.11.5.2.), geçiş (Şekil 4.11.5.3.) ve merkez (Şekil 4.11.5.4.) gibi farklı bölgelerde geçirdikleri sürenin de değerlendirilmesiyle anksiyete ve korku benzeri davranışlar incelenmiştir. İskemi sonrası hayvanlar kenar bölgesinde testin yüksek duvarlarının yanında zaman geçirmeyi bu alanda kendilerini daha güvende hissettikleri için tercih etmektedirler. Kontrol grubuyla kıyaslandığında uzun dönemde hem CDFN tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kenar bölgesinde geçirilen süreyi azaltmıştır (Şekil 4.11.5.2.). Laboratuvar hayvanlarında kendi içlerinden gelen araştırma benzeri davranışlar ve yeni yerleri keşfetme içgüdüleri vardır. Bu gibi davranışlar da bu teste geçiş ve merkez alanında geçirdikleri süreler olarak yansımaktadır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında uzun dönemde hem CDFN tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da geçiş ve merkez alanında geçirilen süreyi arttırmıştır (Şekil 4.11.5.3. ve 4.11.5.4.).

Uzun dönemde aksonal projeksiyonun belirlenmesi için 55 gün setindeki tüm gruplardan her bir hayvandan alınan kesitler immünofloresan yöntemi ile boyanmış ve kontralateralden ipsilaterale geçebilen aksonlar değerlendirilmiştir. Akut olarak iskemik bölgedeki nöronların hayatta kalımını sağlamak ve apoptotik hücre ölümünü azaltmak kadar kronik dönemde kontralateralden ipsilateral akson uzamasını sağlamak da tercih edilen tedavi mekanizmaları arasında yer almaktadır. Uzun dönemde görülen davranış testlerinin sonuçlarıyla paralel olarak kontrol grubuyla kıyaslandığında hem CDFN tedavisi hem de MANF tedavisi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde aksonal projeksiyonu arttırmıştır (Şekil 4.12.1.). Literatürde daha önce özellikle immünohistokimya boyamaları kullanılarak yapılan çalışmalarda, fokal iskemi sonrası iskemik hemisferde kısa mesafe de olsa aksonal uzamanın olduğu (Carmichael vd., 2001) tarafından ve yeni dentrit oluşumu gösterilmiştir (Brown vd., 2007). Bu sonuçlar CDFN ve MANF'ın kontralateral hemisferde yeniden doku modellenmesinde görev alarak aksonal uzamayı sağladığını göstermektedir.

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

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, CDFN ve MANF gibi diğer nörotrofik faktörlerden hem daha küçük hem de daha farklı bir yapıya sahip olan iki nörotrofik faktörün

iskemik hasarda zamana bağlı olarak etki ettiği mekanizmaların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Zamana bağlı olarak hasara ve plastisiteye etki eden mekanizmaların araştırılmasıyla birlikte elde edilen bilgilerle bu nörotrofik faktörlerin veya benzer mekanizmaları kullanabilecek başka hedef moleküllerin translasyonel çalışmalarda kullanılma potansiyeli olduğu düşünölmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adeoye, O., Pancioli, A., Khoury, J., Moomaw, C.J., Schmit, P., Ewing, I., Alwell, K., Flaherty, M.L., Woo, D., Ferioli, S., Khatri, P., Broderick, J.P., Kissela, B.M. Kleindorfer, D. 2012. "Efficiency of enrollment in a successful phase II acute stroke clinical trial", *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 21(8), 667-72.
- Airaksinen, M.S. Saarma, M. 2002. "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value", *Nat Rev Neurosci*, 3(5), 383-94.
- Airavaara, M., Shen, H., Kuo, C.C., Peranen, J., Saarma, M., Hoffer, B. Wang, Y. 2009. "Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats", *J Comp Neurol*, 515(1), 116-24.
- Airavaara, M., Chiocco, M.J., Howard, D.B., Zuchowski, K.L., Peranen, J., Liu, C., Fang, S., Hoffer, B.J., Wang, Y. Harvey, B.K. 2010. "Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury", *Exp Neurol*, 225(1), 104-13.
- Allan, S.M. Rothwell, N.J. 2001. "Cytokines and acute neurodegeneration", *Nat Rev Neurosci*, 2(10), 734-44.
- Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J. Fang, S. 2008. "Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death", *Exp Cell Res*, 314(13), 2454-67.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. Lindvall, O. 2002. "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke", *Nat Med*, 8(9), 963-70.
- Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Fidler, P.S., Adcock, K.H., Oohira, A., Braistead, J.E., Levine, J.M., Margolis, R.U., Rogers, J.H. Fawcett, J.W. 2000. "Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes", *J Neurosci*, 20(7), 2427-38.
- Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Shearer, M.C., Adcock, K.H., Pesheva, P. Fawcett, J.W. 2002. "Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells", *J Neurosci*, 22(6), 2225-36.
- Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Peruzzotti-Jametti, L., Kilic, E., Kilic, U., Salani, G., Brambilla, E., West, M.J., Comi, G., Martino, G. Hermann, D.M. 2009. "Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms", *Brain*, 132(Pt 8), 2239-51.
- Bayat, M., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Goshadrou, F., Ronaghi, A. Mehdizadeh, M. 2012. "Netrin-1 improves spatial memory and synaptic plasticity impairment following global ischemia in the rat", *Brain Res*, 1452(185-94).

Bechmann, I. Nitsch, R. 1997. "Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique", *Glia*, 20(2), 145-54.

Beker, M.C., Caglayan, A.B., Kelestemur, T., Caglayan, B., Yalcin, E., Yulug, B., Kilic, U., Hermann, D.M. Kilic, E. 2015. "Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation", *Oncotarget*, 6(31), 30604-14.

Bolanos, J.P., Heales, S.J., Peuchen, S., Barker, J.E., Land, J.M. Clark, J.B. 1996. "Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione", *Free Radic Biol Med*, 21(7), 995-1001.

Bonita, R., Anderson, C.S., Broad, J.B., Jamrozik, K.D., Stewart-Wynne, E.G. Anderson, N.E. 1994. "Stroke incidence and case fatality in Australasia. A comparison of the Auckland and Perth population-based stroke registers", *Stroke*, 25(3), 552-7.

Brown, C.E., Li, P., Boyd, J.D., Delaney, K.R. Murphy, T.H. 2007. "Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke", *J Neurosci*, 27(15), 4101-9.

Cao, Y., Vikingstad, E.M., Huttenlocher, P.R., Towle, V.L. Levin, D.N. 1994. "Functional magnetic resonance studies of the reorganization of the human hand sensorimotor area after unilateral brain injury in the perinatal period", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20), 9612-6.

Carmichael, S.T., Wei, L., Rovainen, C.M. Woolsey, T.A. 2001. "New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke", *Neurobiol Dis*, 8(5), 910-22.

Carr, L.J., Harrison, L.M., Evans, A.L. Stephens, J.A. 1993. "Patterns of central motor reorganization in hemiplegic cerebral palsy", *Brain*, 116 (Pt 5)(1223-47.

Chen, P., Goldberg, D.E., Kolb, B., Lanser, M. Benowitz, L.I. 2002. "Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 9031-6.

Cheng, L., Zhao, H., Zhang, W., Liu, B., Liu, Y., Guo, Y. Nie, L. 2013. "Overexpression of conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) in astrocytes alleviates endoplasmic reticulum stress-induced cell damage and inflammatory cytokine secretion", *Biochem Biophys Res Commun*, 435(1), 34-9.

Cook, G., Tannahill, D. Keynes, R. 1998. "Axon guidance to and from choice points", *Curr Opin Neurobiol*, 8(1), 64-72.

DeGracia, D.J., Kumar, R., Owen, C.R., Krause, G.S. White, B.C. 2002. "Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death", *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(2), 127-41.

Deller, T. 1998. "The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL)", *Anat Embryol (Berl)*, 197(2), 89-103.

Dirnagl, U., Iadecola, C. Moskowitz, M.A. 1999. "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view", *Trends Neurosci*, 22(9), 391-7.

Doepfner, T.R., Kaltwasser, B., Sanchez-Mendoza, E.H., Caglayan, A.B., Bahr, M. Hermann, D.M. 2017. "Lithium-induced neuroprotection in stroke involves increased miR-124 expression, reduced RE1-silencing transcription factor abundance and decreased protein deubiquitination by GSK3beta inhibition-independent pathways", *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(3), 914-26.

Doherty, P., Fazeli, M.S. Walsh, F.S. 1995. "The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity", *J Neurobiol*, 26(3), 437-46.

Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M. Davis, S.M. 2008. "Stroke", *Lancet*, 371(9624), 1612-23.

Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A. Sugimoto, C. 2003. "PI3K/Akt and apoptosis: size matters", *Oncogene*, 22(56), 8983-98.

Gao, X., Zhang, H., Takahashi, T., Hsieh, J., Liao, J., Steinberg, G.K. Zhao, H. 2008. "The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways", *J Neurochem*, 105(3), 943-55.

Haas, C.A., Rauch, U., Thon, N., Merten, T. Deller, T. 1999. "Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes", *J Neurosci*, 19(22), 9953-63.

Hanada, M., Feng, J. Hemmings, B.A. 2004. "Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target", *Biochim Biophys Acta*, 1697(1-2), 3-16.

Hao, F., Yang, C., Chen, S.S., Wang, Y.Y., Zhou, W., Hao, Q., Lu, T., Hoffer, B., Zhao, L.R., Duan, W.M. Xu, Q.Y. 2017. "Long-term protective effects of AAV9-mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor gene transfer in parkinsonian rats", *Exp Neurol*, 291(120-33).

Hara, H., Harada, K. Sukamoto, T. 1993. "Chronological atrophy after transient middle cerebral artery occlusion in rats", *Brain Res*, 618(2), 251-60.

Hayashi, T., Abe, K., Suzuki, H. Itoyama, Y. 1997. "Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats", *Stroke*, 28(10), 2039-44.

Herz, J., Reitmeir, R., Hagen, S.I., Reinboth, B.S., Guo, Z., Zechariah, A., ElAli, A., Doepfner, T.R., Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Kilic, U., Kilic, E. Hermann, D.M. 2012. "Intracerebroventricularly delivered VEGF promotes contralesional corticorubral plasticity

after focal cerebral ischemia via mechanisms involving anti-inflammatory actions", *Neurobiol Dis*, 45(3), 1077-85.

Hiyama, T., Tanaka, T., Endo, S., Komine, K., Kudo, T., Kobayashi, H. Shiokawa, Y. 2010. "Angiogenesis in atherosclerotic plaque obtained from carotid endarterectomy: association between symptomatology and plaque morphology", *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 50(12), 1056-61.

Horstmann, S., Kahle, P.J. Borasio, G.D. 1998. "Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival in vitro", *J Neurosci Res*, 52(4), 483-90.

Hossmann, K.A. 1993. "Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death", *Prog Brain Res*, 96(161-77).

Huang, Z., Huang, P.L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M.C. Moskowitz, M.A. 1994. "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase", *Science*, 265(5180), 1883-5.

Iadecola, C., Zhang, F. Xu, X. 1995. "Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage", *Am J Physiol*, 268(1 Pt 2), R286-92.

Jones, L.L., Margolis, R.U. Tuszynski, M.H. 2003. "The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury", *Exp Neurol*, 182(2), 399-411.

Katchanov, J., Waeber, C., Gertz, K., Gietz, A., Winter, B., Bruck, W., Dirnagl, U., VEH, R.W. Endres, M. 2003. "Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse", *Brain Pathol*, 13(4), 452-64.

Kilic, E., Reitmeir, R., Kilic, U., Caglayan, A.B., Beker, M.C., Kelestemur, T., Ethemoglu, M.S., Ozturk, G. Hermann, D.M. 2014. "HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia", *Front Cell Neurosci*, 8(422).

Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Abdallah, N.B., Wolfer, D.P., Reiter, R.J., Hermann, D.M. Bassetti, C.L. 2008. "Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice", *J Pineal Res*, 45(2), 142-8.

Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C.L., Schwab, M.E. Hermann, D.M. 2010. "Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain", *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(5), 969-84.

Kovacs, Z., Ikezaki, K., Samoto, K., Inamura, T. Fukui, M. 1996. "VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct", *Stroke*, 27(10), 1865-72; discussion 72-3.

Kubes, P. Granger, D.N. 1992. "Nitric oxide modulates microvascular permeability", *Am J Physiol*, 262(2 Pt 2), H611-5.

- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N. Glimcher, L.H. 2003. "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response", *Mol Cell Biol*, 23(21), 7448-59.
- Levi-Montalcini, R. 1987. "The nerve growth factor: thirty-five years later", *Biosci Rep*, 7(9), 681-99.
- Li, H., Zhang, N., Lin, H.Y., Yu, Y., Cai, Q.Y., Ma, L. Ding, S. 2014. "Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice", *BMC Neurosci*, 15(58).
- Lindholm, P., Peranen, J., Andressoo, J.O., Kalkkinen, N., Kokaia, Z., Lindvall, O., Timmusk, T. Saarma, M. 2008. "MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain", *Mol Cell Neurosci*, 39(3), 356-71.
- Lindholm, P., Voutilainen, M.H., Lauren, J., Peranen, J., Leppanen, V.M., Andressoo, J.O., Lindahl, M., Janhunen, S., Kalkkinen, N., Timmusk, T., Tuominen, R.K. Saarma, M. 2007. "Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo", *Nature*, 448(7149), 73-7.
- Liu, H.M. Chen, H.H. 1994a. "Correlation between fibroblast growth factor expression and cell proliferation in experimental brain infarct: studied with proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry", *J Neuropathol Exp Neurol*, 53(2), 118-26.
- Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C. Feuerstein, G.Z. 1994b. "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons", *Stroke*, 25(7), 1481-8.
- Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert, T. Chopp, M. 2005. "Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury", *J Neurotrauma*, 22(9), 1011-7.
- Lucivero, V., Prontera, M., Mezzapesa, D.M., Petruzzellis, M., Sancilio, M., Tinelli, A., Di Noia, D., Ruggieri, M. Federico, F. 2007. "Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke", *Neurol Sci*, 28(4), 165-70.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G. Cowan, A.I. 1994. "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?", *Trends Neurosci*, 17(6), 251-7.
- Matthews, D.A., Cotman, C. Lynch, G. 1976. "An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration", *Brain Res*, 115(1), 1-21.
- Mauldin, P.D., Simpson, K.N., Palesch, Y.Y., Spilker, J.S., Hill, M.D., Khatri, P., Broderick, J.P. Interventional Management of Stroke, I.I.I.I. 2008. "Design of the economic evaluation for the Interventional Management of Stroke (III) trial", *Int J Stroke*, 3(2), 138-44.

McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S. Silver, J. 1991. "Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes", *J Neurosci*, 11(11), 3398-411.

Mizobuchi, N., Hoseki, J., Kubota, H., Toyokuni, S., Nozaki, J., Naitoh, M., Koizumi, A. Nagata, K. 2007. "ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element", *Cell Struct Funct*, 32(1), 41-50.

Montaner, J., Alvarez-Sabin, J., Molina, C., Angles, A., Abilleira, S., Arenillas, J., Gonzalez, M.A. Monasterio, J. 2001. "Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment", *Stroke*, 32(8), 1759-66.

Murphy, T.H. Corbett, D. 2009. "Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour", *Nat Rev Neurosci*, 10(12), 861-72.

Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T. Nakafuku, M. 2002. "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors", *Cell*, 110(4), 429-41.

Noshita, N., Sugawara, T., Hayashi, T., Lewen, A., Omar, G. Chan, P.H. 2002. "Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice", *J Neurosci*, 22(18), 7923-30.

Oppenheim, R.W. 1991. "Cell death during development of the nervous system", *Annu Rev Neurosci*, 14(453-501).

Overman, J.J., Clarkson, A.N., Wanner, I.B., Overman, W.T., Eckstein, I., Maguire, J.L., Dinov, I.D., Toga, A.W. Carmichael, S.T. 2012. "A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33), E2230-9.

Palgi, M., Lindstrom, R., Peranen, J., Piepponen, T.P., Saarma, M. Heino, T.I. 2009. "Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2429-34.

Pang, L., Ye, W., Che, X.M., Roessler, B.J., Betz, A.L. Yang, G.Y. 2001. "Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression", *Stroke*, 32(2), 544-52.

Papadopoulos, C.M., Tsai, S.Y., Alsbiei, T., O'Brien, T.E., Schwab, M.E. Kartje, G.L. 2002. "Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat", *Ann Neurol*, 51(4), 433-41.

Pedrono, E., Durukan, A., Strbian, D., Marinkovic, I., Shekhar, S., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U. Tatlisumak, T. 2010. "An optimized mouse model for transient ischemic attack", *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(2), 188-95.

Petrova, P., Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., Moore, M.K., Peaire, A.E., Shridhar, V., Smith, D.I., Kelly, J., Durocher, Y. Commissiong, J.W. 2003. "MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons", *J Mol Neurosci*, 20(2), 173-88.

Qiu, J., Takagi, Y., Harada, J., Rodrigues, N., Moskowitz, M.A., Scadden, D.T. Cheng, T. 2004. "Regenerative response in ischemic brain restricted by p21cip1/waf1", *J Exp Med*, 199(7), 937-45.

Reeves, W.B., Kwon, O. Ramesh, G. 2008. "Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury", *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4), F731-8.

Reitmeir, R., Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., ElAli, A., Salani, G., Pluchino, S., Gassmann, M. Hermann, D.M. 2011. "Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity", *Brain*, 134(Pt 1), 84-99.

Sbarbati, A., Pietra, C., Baldassarri, A.M., Guerrini, U., Ziviani, L., Reggiani, A., Boicelli, A. Osculati, F. 1996. "The microvascular system in ischemic cortical lesions", *Acta Neuropathol*, 92(1), 56-63.

Seymour, A.B., Andrews, E.M., Tsai, S.Y., Markus, T.M., Bollnow, M.R., Brenneman, M.M., O'Brien, T.E., Castro, A.J., Schwab, M.E. Kartje, G.L. 2005. "Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats", *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(10), 1366-75.

Shamloo, M., Rytter, A. Wieloch, T. 1999. "Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning", *Neuroscience*, 93(1), 81-8.

Shen, C.P., Tsimberg, Y., Salvatore, C. Meller, E. 2004. "Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions", *BMC Neurosci*, 5(36).

Skaper, S.D. Walsh, F.S. 1998. "Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration", *Mol Cell Neurosci*, 12(4-5), 179-93.

Sun, Y., Jin, K., Childs, J.T., Xie, L., Mao, X.O. Greenberg, D.A. 2004. "Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice", *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(10), 1146-52.

Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J.I., Ushio, Y. Mori, M. 2004. "Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP", *Cell Death Differ*, 11(4), 403-15.

Tang, X., Davies, J.E. Davies, S.J. 2003. "Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and

tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue", *J Neurosci Res*, 71(3), 427-44.

Tessier-Lavigne, M. Goodman, C.S. 1996. "The molecular biology of axon guidance", *Science*, 274(5290), 1123-33.

van der Lee, J.H., Wagenaar, R.C., Lankhorst, G.J., Vogelaar, T.W., Deville, W.L. Bouter, L.M. 1999. "Forced use of the upper extremity in chronic stroke patients: results from a single-blind randomized clinical trial", *Stroke*, 30(11), 2369-75.

Voutilainen, M.H., Back, S., Porsti, E., Toppinen, L., Lindgren, L., Lindholm, P., Peranen, J., Saarma, M. Tuominen, R.K. 2009. "Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease", *J Neurosci*, 29(30), 9651-9.

Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R. Chopp, M. 2004a. "Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats", *Stroke*, 35(7), 1732-7.

Wang, Y., Ying, G.X., Liu, X., Wang, W.Y., Dong, J.H., Ni, Z.M. Zhou, C.F. 2005. "Induction of ephrin-B1 and EphB receptors during denervation-induced plasticity in the adult mouse hippocampus", *Eur J Neurosci*, 21(9), 2336-46.

Wang, Z.Q., Wu, D.C., Huang, F.P. Yang, G.Y. 2004b. "Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia", *Brain Res*, 996(1), 55-66.

Wiessner, C., Bareyre, F.M., Allegrini, P.R., Mir, A.K., Frentzel, S., Zurini, M., Schnell, L., Oertle, T. Schwab, M.E. 2003. "Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats", *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(2), 154-65.

Winter, B., Juckel, G., Viktorov, I., Katchanov, J., Gietz, A., Sohr, R., Balkaya, M., Hortnagl, H. Endres, M. 2005. "Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice", *Biol Psychiatry*, 57(10), 1166-75.

Wolf, S.L., Blanton, S., Baer, H., Breshears, J. Butler, A.J. 2002. "Repetitive task practice: a critical review of constraint-induced movement therapy in stroke", *Neurologist*, 8(6), 325-38.

Wu, T.W., Li, W.W. Li, H. 2008. "Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis", *Neuroscience*, 156(3), 475-82.

Zhang, F., Casey, R.M., Ross, M.E. Iadecola, C. 1996. "Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion", *Stroke*, 27(2), 317-23.

Zhao, H., Shimohata, T., Wang, J.Q., Sun, G., Schaal, D.W., Sapolsky, R.M. Steinberg, G.K. 2005. "Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats", *J Neurosci*, 25(42), 9794-806.

Zheng, X.R., Zhang, S.S., Yang, Y.J., Yin, F., Wang, X., Zhong, L. Yu, X.H. 2010. "Adenoviral vector-mediated transduction of VEGF improves neural functional recovery after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats", *Brain Res Bull*, 81(4-5), 372-7.