

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNE BAĞLI
ÖĞRENME VE HAFIZA DEĞİŞİKLİKLERİNE
TRANSKRANİYAL DOĞRU AKIM STİMÜLASYONUNUN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Güven AKÇAY

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNE BAĞLI
ÖĞRENME VE HAFIZA DEĞİŞİKLİKLERİNE
TRANSKRANİYAL DOĞRU AKIM STİMÜLASYONUNUN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Güven AKÇAY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Narin DERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3712 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca her konuda yol göstericim olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Narin DERİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince desteklerini benden esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ, Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR, Prof. Dr. Nazmi YARAŞ ve Prof. Dr. Murat CANPOLAT'a,

Bilimsel çalışmalarımda yoluma ışık tutan Prof. Dr. Mehmet BÜLBÜL, Prof. Dr. Mutay ASLAN, Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN, Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem GÖKÇEK SARAÇ'a,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Deney Hayvanları Ünitesinin tüm çalışanlarına,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olan ekip arkadaşım Arş. Gör. Betül DANIŞMAN başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan çok kıymetli ablalarım Hanife KAVCAR, Nuran ŞAHİN, Suzan OKAN YILMAZ ve Sebiha KARTAL'a,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan annem Gülten AKÇAY, babam Ziyeddin AKÇAY, ağabeyim Ufuk AKÇAY, ablam Beyhan ZENBİLCİ, kardeşim Burcu KUZAYTEPE ve tüm aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda fokal serebral iskemi oluşturulan sıçanlarda Transkranial Doğru Akım Stimülasyon (tDAS) uygulamasının öğrenme ve hafıza üzerine etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Her grupta 20 sıçan olmak üzere 100 adet 290-310 gr ağırlığında erkek Wistar sıçanlar Sham, tDAS, İskemi/Reperfüzyon (İR), İR+tDAS ve İR+E-tDAS grubu olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. Öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için yeni obje tanıma, obje lokalizasyon ve Y-maze testleri, lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için ise açık alan testi kullanılmıştır. Hipokampus dokularında glutamat ve glutamin düzeyleri, AMPA, NMDA, VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2 ve EAAT-3 mRNA ekspresyonları değerlendirilmiştir. İskemik alanlar TTC boyaması ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Motor davranış indeksi iskeminin 1. gününde İR yapılan tüm gruplarda anlamlı derecede artmış, ancak 7. günde İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında İR grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Davranış deneyleri verilerinde Sham grubuna kıyasla İR grubunda anlamlı düşüş görülürken, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında ise İR'ye göre anlamlı artış görülmüştür. Glutamat ve glutamin düzeyleri, AMPA ve NMDA reseptör ekspresyonları ile VGLUT1 ve EAAT1 mRNA ekspresyonları İR grubunda anlamlı derecede yüksek, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında ise İR grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Sham grubuna göre İR grubunda EAAT2 mRNA ekspresyonu anlamlı olarak azalırken, EAAT3 mRNA ekspresyonu değişmemiştir. İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında EAAT2 ve EAAT3 ekspresyonları İR grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir. İR grubuna kıyasla İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında iskemik alanlar anlamlı derecede azalmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda İR sonrası tDAS uygulamasının, öğrenme ve hafıza bozukluklarını iyileştirebileceği ve tDAS'ın bu etkilerini glutamat seviyesini düzenleyen taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleştirebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: iskemi reperfüzyon, tDAS, öğrenme ve hafıza, glutamat

ABSTRACT

Objective: In our study, we aimed to investigate the effects of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) application on learning and memory and molecular mechanisms of rats with focal cerebral ischemia.

Method: 100 male Wistar rats, each of which weighs 290-310 g, were divided into five groups as Sham, tDCS, Ischemia/Reperfusion (IR), IR+tDCS and IR+E-tDCS groups, with 20 rats in each group. Novel object recognition, object localization and Y-maze tests were used to evaluate learning and memory, and open field test was performed to evaluate locomotor activity. Glutamate and glutamine levels, AMPA, NMDA, VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2 and EAAT-3 mRNA expressions in hippocampus tissues were evaluated. Ischemic areas were analyzed by TTC staining.

Results: Motor behavior index increased significantly in all groups where IR was applied on the first day of ischemia, but on the 7th day, it was significantly decreased in IR+tDCS and IR+E-tDCS groups compared to IR group. Increase was observed in IR+tDCS and IR+E-tDCS groups compared to IR group while significant decrease was observed in IR group compared to Sham in the behavioral experiments data. While glutamate and glutamine levels, AMPA and NMDA receptor expressions and VGLUT1 and EAAT1 mRNA expressions were significantly higher in IR group compared to Sham group, it was found to be significantly lower in IR+ tDAS and IR+ E-tDAS groups compared to IR group. In IR group compared to Sham group EAAT2 mRNA expression was significantly decreased, while EAAT3 mRNA expression did not change. EAAT2 and EAAT3 expressions were significantly higher in IR+tDCS and IR+E-tDCS groups compared to the IR group. Ischemic areas were significantly decreased in IR+tDCS and IR+E-tDCS groups compared to IR group.

Conclusion: In our study, it has been shown that post-IR tDCS application improves learning and memory disorders and tDCS achieves these effects through the carriers that regulate glutamate level.

Key words: ischemia reperfusion, tDCS, learning and memory, glutamate

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnme	3
2.1.1. Risk Faktörleri	4
2.1.2. Serebral Vasküler Anatomi	5
2.1.3. DeneySEL İskemi Reperfüzyon Modelleri	6
2.1.4. Serebral Kan Akımı (SKA) ve İskemik Alanın Bölgeleri	7
2.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	12
2.2. Hipokampus	13
2.3. Glutamat	17
2.4. Nöromodülasyon ve Doğru Akım Stimulasyonu	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Deney Grupları ve Protokolü	28
3.1.1 Deney Protokolü	28
3.1.2. İskemik Sıçan Model	29
3.1.3. tDAS Uygulaması	31
3.2. Davranış Deneyleri	32
3.2.1. Açık Alan Testi	32

3.2.2. Yeni Obje Tanıma Testi	33
3.2.3. Obje Lokalizasyon Testi	34
3.2.4. Y-Maze Testi	35
3.3. Doku Alımı ve Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	36
3.3.1 Doku Alımı	36
3.3.2. Kütle Spektrometresi ile Glutamat ve Glutamin Tayini	37
3.3.3. VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, NMDA1, NMDA2 ve AMPA Reseptör Düzeylerinin RT-PCR Analizi	38
3.3.4. Trifeniltetrazolyum Klorür ile İskemik Hasarın Tespiti	40
3.4. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Vücut Ağırlıkları ve Motor Davranış İndeksi Bulguları	42
4.2. Açık Alan Testi Bulguları	44
4.3. Yeni Obje Tanıma Testi Bulguları	45
4.4. Obje Lokalizasyon Testi Bulguları	45
4.5. Y-Maze Testi Bulguları	46
4.6. Glutamat ve Glutamin Düzeyi Bulguları	47
4.7. VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3 mRNA Ekspresyon Bulguları	47
4.8. AMPA1, NMDA1 ve NMDA2A Reseptör mRNA Ekspresyon Bulguları	49
4.9. İskemik Hasar Bulguları	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. İnmede risk faktörleri	4
Tablo 2.2. Deneysel serebral iskemi hayvan modelleri	7
Tablo 2.3. Fizyolojik serebral kan değerleri	8
Tablo 2.4. Patolojik serebral kan akımı değerleri	12
Tablo 2.5. Eksitator aminoasit taşıyıcıları	20
Tablo 3.1. Real-time PCR primer sekansları	39
Tablo 4.1. Vücut ağırlıkları ve motor davranış indeksi bulguları	43
Tablo 4.2. Açık alan testi bulguları	44
Tablo 4.3. Yeni obje tanıma testi bulguları	45
Tablo 4.4. Objelokalizasyon testi bulguları	46
Tablo 4.5. Y maze testi bulguları	47
Tablo 4.6. Hipokampus dokusunda glutamin ve glutamat düzeyi bulguları	47
Tablo 4.7. Hipokampus dokusunda VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 mRNA ekspresyon bulguları	48
Tablo 4.8. Hipokampus dokusunda AMPAR1, NMDAR1 ve NMDAR2A mRNA ekspresyon bulguları	49
Tablo 4.9. İskemik hasar bulguları	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnme tipleri	5
Şekil 2.2. Beyni besleyen arterler	6
Şekil 2.3. Willis poligonu	7
Şekil 2.4. İskemik hasarın oluş mekanizmaları	10
Şekil 2.5. İskemik alanın bölgeleri	11
Şekil 2.6. Hipokampus anatomisi	14
Şekil 2.7. Papez devresi	15
Şekil 2.8. Hafıza türleri	16
Şekil 2.9. Hipokampal oluşum	17
Şekil 2.10. Glutamat-glutamin döngüsü	19
Şekil 2.11. Glutamat reseptörleri	22
Şekil 2.12. Anodal ve katodal tDAS uyarımı sonrası beyin aktivitesi	25
Şekil 2.13. Anodal ve katodal tDAS uyarımının nöronlar üzerindeki etkisi	26
Şekil 3.1. Deney protokolü	29
Şekil 3.2. OSA oklüzyonu ve ilk 4 saat hasar bölgeleri	30
Şekil 3.3. OSA iskemi/reperfüzyon cerrahi işlemleri	31
Şekil 3.4. tDAS uygulaması	32
Şekil 3.5. Noldus Ethovision XT sistemi	32
Şekil 3.6. Açık alan testi deney aşamaları	33
Şekil 3.7. Yeni obje tanıma testi deney aşamaları	34
Şekil 3.8. Objelokalizasyon testi deney aşamaları	35
Şekil 3.9. Y maze testi deney aşamaları	36
Şekil 3.10. Beyin ve hipokampus diseksiyonu	37
Şekil 3.11. TTC boyamanın beyin kesitleri	41
Şekil 4.1. Vücut ağırlıkları ve motor davranış indeksi bulguları	43
Şekil 4.2. Açık alan testi bulguları	44
Şekil 4.3. Yeni obje tanıma testi bulguları	45
Şekil 4.4. Objelokalizasyon testi bulguları	46
Şekil 4.5. Y maze testi bulguları	46

Şekil 4.6. Hipokampus dokusunda glutamat ve glutamin düzeyi bulguları	47
Şekil 4.7. Hipokampus dokusunda VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 mRNA ekspresyon bulguları	48
Şekil 4.8. Hipokampus dokusunda AMPAR1, NMDAR1 ve NMDAR2A mRNA ekspresyon bulguları	49
Şekil 4.9. TTC boyamaları	50
Şekil 4.10. İskemik hasar bulguları	50



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPA	: Alfa-Amino-3-Hidroksi-5- Metil-4-İzoksazol Propionik Asit
AMPAR	: Alfa-Amino-3-Hidroksi-5- Metil-4-İzoksazol Propionik Asit Reseptörü
ATP	: Adenozin Trifosfat
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
CA	: Cornu Ammonis
DG	: Dentat Girus
EAAT	: Eksitator Aminoasit Taşıyıcıları
EK	: Entorinal Korteks
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
İR	: İskemi Reperfüzyon
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NMDAR	: N-Metil-D-Aspartat Reseptörü
NO	: Nitrik Oksit
OSA	: Orta Serebral Arter
OSAO	: Orta Serebral Arter Oklüzyonu
SKA	: Serebral Kan Akımı
tDAS	: Transkraniyal Doğru Akım Stimulasyonu
TMS	: Transkraniyel Manyetik Stimülasyon
TTC	: Trifeniltetrazolyum Klorür
VGLUT	: Veziküler Glutamat Taşıyıcıları

1. GİRİŞ

Beynimiz toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sine karşılık gelmesine rağmen kardiyak debinin yaklaşık olarak % 20'sini, toplam oksijenin de % 25'ini ve glikozun da % 25'ini kullanmaktadır. Tüm vücudumuzda olduğu gibi beynimizdeki nöronların da birincil enerji kaynağı adenosin trifosfat (ATP)'dir. Beyindeki nöronlar glikojen depolayamadıkları için sürekli olarak glikoza ihtiyaç duymaktadırlar. Yetişkin bir insanın beynindeki kan akımına baktığımızda dinlenme hâlinde 100 gr doku için 50-55 ml/dk olup, kan akımı 18-20 ml/dk'nın altına düşerse hücrelerde fonksiyon bozukluğu başlamakta, 8-10 ml/dk'nın altına düştüğünde ise ölüm gerçekleşmektedir (Kumral, 2011). Beynin beslenmesinde serebral kan akımı en önemli yeri oluşturmakta ve seçilmiş bir beyin bölgesinde veya tüm beyinde oluşan serebral kan akımındaki azalma sonucu beyin iskemisi gerçekleşmektedir. Beyni kanlandıran serebral arter tıkanıp zaman, arterin beslediği alanın merkez bölgesindeki kan akımı kritik düzeyin altına düşmekte ve merkezin hemen çevresindeki alanlar için de kan akımı, nöronların fonksiyonunu ve canlılığını sürdürmesi için yetersiz kalmaktadır (Kumral, 2011). Beyinde oluşan iske mi, ATP eksikliğinden dolayı $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompa aktivitesinin bozulmasına, membran potansiyelinin değişmesine, nöronlarla glial hücrelerin depolarize olmasına ve nöronlardan nörotransmitterlerin salınmasına neden olmaktadır (Kumral, 2011). Bunun sonucunda dakikalar içerisinde presinaptik uçtan ekstrasellüler aralığa aşırı miktarda glutamat ve aspartat salınımı gerçekleşmektedir (Kutluk, 2004; Liang ve ark., 2004). İskemik hasar sonucu bir taraftan glutamatın salınımı artarken diğer taraftan da enerji bağımlı glutamat geri alım mekanizmalarının bozulması sonucu ekstrasellüler aralıkta yüksek miktarda glutamat birikmesi eksitotoksik etkiye neden olmaktadır (Kutluk, 2004; Liang ve ark., 2004). Ekstrasellüler aralıkta artan glutamat, N-metil-D-aspartat (NMDA) ve alfa-amino-3-hidroksi-5- metil-4-izoksazol propionik asit (AMPA) reseptörlerine bağlanarak şiddetli ve devamlı depolarizasyon meydana getirmekte, hücre içine bol miktarda Ca^{+2} girişi gerçekleşerek reaktif oksijen türleri artmakta, anormal transkripsiyon gerçekleşmekte, ATPaz, fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktivasyonu artarak hücre ölümüne yol açmaktadır (Girotti, 1998; Arundine ve Tymianski, 2004; Pandya ve ark., 2011). Sinaptik aralıkta fazla bulunan glutamatın hücre içine geri alımı hem nöronlarda hem de glialarda bulunan eksitator aminoasit taşıyıcıları (EAAT) tarafından alınarak sağlanmaktadır. Chen ve ark. (Chen ve ark., 2005) sıçanlar üzerinde yaptıkları geçici global iske mi

çalışmasında, reperfüzyonun 7.gününde kontrole göre iskemi grubunun hipokampus Cornu Ammonis 1 (CA1) bölgelerinin EAAT1 ve EAAT3 protein düzeylerinde artış ve EAAT2 düzeyinde ise azalma olduğunu bildirmişlerdir. Presinaptik sinir terminallerinde sentezlenen glutamat, veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) aracılığıyla veziküllerin içine alınmakta ve depolanmaktadır (Danbolt, 2001). VGLUT seviyelerinde artış, hipoksik hasar, stres, gibi çeşitli durumlardan sonra gözlenmektedir (Daniels ve ark., 2011). VGLUT seviyesindeki aşırı ekspresyon, her vezikülden salınan glutamat miktarında artış ile sonuçlanmaktadır (Daniels ve ark., 2011). İskemiden en çok etkilenen beyin bölgelerinin hipokampus, striatum ve prefrontal korteks olduğu bilinmektedir (Chen ve ark., 2005). Nitekim Kim ve ark. (Kim ve ark., 2005) yaptıkları çalışmada hipoksik hasarın hipokampusta VGLUT1 artışına neden olduğunu göstermişlerdir. Hipokampus uzaysal hafızadan, öğrenmeden ve kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya aktarılmasından sorumlu en önemli beyin bölgesi olup, hipokampusu hasar görmüş kişilerde kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmesinde sorun yaşandığı bilinmektedir (Danbolt, 2001).

İnme vakalarının yaklaşık olarak % 80-85'ini iskemik inme oluşturmaktadır. İnme sonrası hem motor hem de bilişsel fonksiyonlarda önemli bozukluklar ortaya çıkmaktadır. İnme yüksek bir görülme sıklığına sahip olmasına rağmen henüz etkin bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır. İnvazif olmayan bir beyin uyarıcı tekniği olan transkraniyal doğru akım stimülasyonu (tDAS) nöroprotektif özelliğe sahip olması inme tedavisinde kullanılmaktadır. İnmeyle ilgili öğrenme ve hafızası bozukluğunu farklı teknikler ile tedavi eden araştırmalar olsa da tDAS ile tedavi eden herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır. Projemizde iskemi reperfüzyon sonrası oluşan öğrenme ve hafıza değişikliklerine tDAS uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Ayrıca iskemi sonrası tDAS uygulamasının öğrenmede önemli rol oynayan glutamat düzeyi, NMDA ve AMPA reseptörleri, EAAT1, EAAT2, EAAT3 ve VGLUT1 taşıyıcıları üzerinde etkisini araştıran ilk çalışma olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnme

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre inme; serebral, spinal kord veya retinada, fokal infarkt veya hemoraji sonucu ani gelişen, fokal nörolojik işlev bozukluğu veya ölümle sonuçlanabilen klinik bir durumdur (Sacco ve ark., 2013). İnme, nörolojik hastalıklar arasında birinci sırada, dünyadaki ölümlerin nedenlerine baktığımızda ise kardiyovasküler hastalıklardan (% 14.8) sonra ikinci sırada (inme % 11.8) yer almaktadır (Sacco ve ark., 2013). Ülkelerin gelişmişlik durumuna bağlı olarak bu sıralama değişmekte olup, Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde inme ölüm nedenleri içerisinde ikinci sıradayken, gelişmiş ülkelerde ise üçüncü sırada yer almaktadır (Feigin ve ark., 2015). Dünyada her yıl yaklaşık olarak 17 milyon kişide inme gerçekleşmekte ve 6 milyon kişi inme sebebiyle hayatını kaybetmektedir (Benjamin ve ark., 2018). Amerika'da her 40 saniyede bir inme vakası ortaya çıkmaktadır (Benjamin ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada, 2013 yılında inmeye bağlı ölüm sayısının 6.5 milyon ve sakat kalan kişi sayısının ise 113 milyon olduğu rapor edilmiştir (Feigin ve ark., 2015). 2030 yılında yaklaşık olarak 70 milyon kişinin inme tehlikesi ile karşı karşıya kalacağı, 12 milyon kişinin inmeye bağlı olarak hayatını kaybedeceği ve 200 milyonun üzerinde kişinin de inme sonucu sakat kalacağı tahmin edilmektedir (Feigin ve ark., 2014). İnme vakalarının % 25'inde tam iyileşme, % 30'unda hafif sakatlıklar, % 15'inde orta sakatlıklar, % 15'inde ağır sakatlıklar ve % 15'inde de ölüm görülmektedir (Kumral, 2011). Gelişmekte olan ülkelerde inmenin erken döneminde ölüm oranının % 25 daha fazla olduğu görülmüştür (Mukherjee ve Patil, 2011). Ülkemizde inme insidansı 177/100.000, prevalansı ise 254/100.000 olarak bildirilmiştir (Kablan, 2018). Bu veriler bize her yıl yaklaşık olarak 132.000 yeni inme vakası olduğunu ve 191.000 kişinin de inmeye bağlı komplikasyonlarla yaşamını sürdürdüğünü ifade etmektedir (Kablan, 2018). Son yıllarda, dünya genelinde gelişmiş ülkelerde inme insidansı ve ölüm oranlarında azalma olduğu, gelişmekte olan ülkelere ise herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir (Feigin ve ark., 2017). Gelişmiş ülkelerde tanı imkânlarının artması ve tedavide yeni yöntemlerin gelişmesi ile birlikte inmenin sebep olduğu ölüm oranlarında azalma görülmüştür (Feigin ve ark., 2015; Kablan, 2018). Gelişmekte olan ülkelere baktığımızda, tanı ve tedavinin yetersizliği, yaşlı nüfusunun fazla olmasından dolayı inme oranının daha yüksek olduğu, yaşlı nüfusun giderek artması nedeniyle bu oranın daha da yükseleceği tahmin edilmektedir

(Feigin ve ark., 2015). Dünya genelinde inme riski yaş ilerledikçe artış göstermekte ve özellikle 55 yaşından sonra inme riski her dekatta 2 kat artmaktadır (Boehme ve ark., 2017). Yaşlı nüfusu, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde artış gösterdiğinden, gelecekte inme olgularında hızlı bir artışın yaşanacağı, bu durumun sağlıkla ve ekonomiyle ilgili sorunlara neden olacağı tahmin edilmektedir. Sonuç olarak inmenin önlenmesi ve etkin tedavilerin uygulanması ülkemiz açısından da önem arz etmektedir.

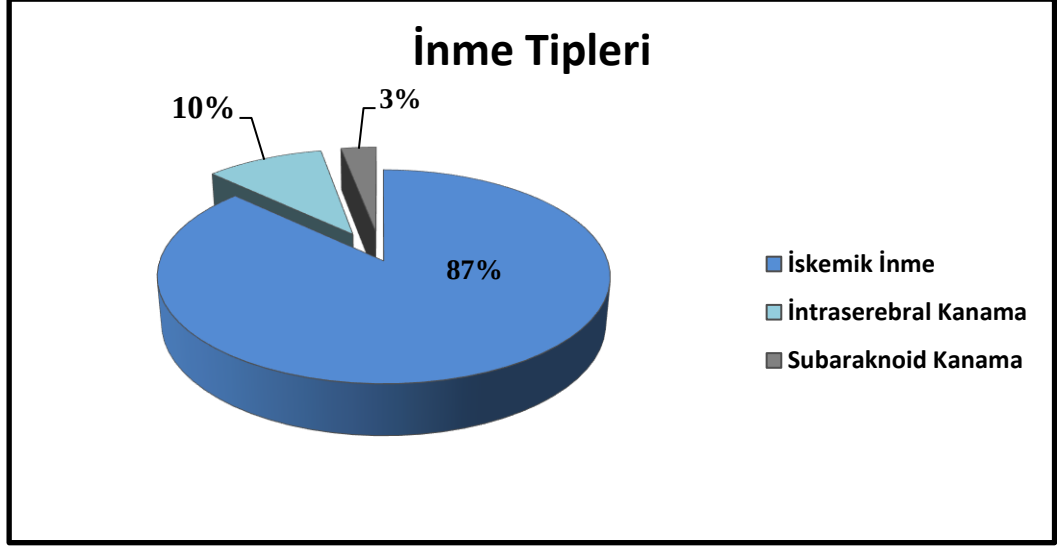
2.1.1. Risk Faktörleri

Son yıllarda risk faktörlerinin belirlenmesi, hastaya uygulanan tedavinin erken ve etkili olması nedeniyle inme mortalitesinde azalma ve yaşam kalitesinde artma olduğu görülmüştür (Kumral, 2011). İnmenin tedavisi ile risk faktörleri arasında güçlü bir ilişki olduğundan, inme tedavisi kadar risk faktörlerinin belirlenmesi de önemlidir. İnme ile ilgili risk faktörleri değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu risk faktörleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir (Kumral, 2011).

Tablo 2.1. İnmede risk faktörleri

RİSK FAKTÖRLERİ		
Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	Değiştirilebilen Risk Faktörleri	
Yaş	Hipertansiyon	Obezite
Cinsiyet	Diabetes Mellitus	Alkol
İrk/Etnisite/Köken	Fiziksel İnaktivite	Sigara
Genetik	Dislipidemi	Diyet
	Böbrek Hastalıkları	İnflamasyon
	Hava Kirliliği	İlaç kullanımı
	Kardiyak Nedenler (AF vs.)	
	Asemptomatik karotis stenozu	

İnmenin, iskemik ve hemorajik inme olmak üzere iki tipi vardır. Tromboz, emboli ya da sistemik hipoperfüzyon sonucu oluşmuş ise iskemik inme, intraserebral veya subaraknoid kanama sonucu oluşmuş ise de hemorajik inme olarak adlandırılmaktadır (Kumral, 2011; Kablan, 2018). Dünyada görülen inmelerin % 87'sini iskemik inme, % 10'unu intraserebral ve % 3'ünü ise subaraknoid kanamalar oluşturmaktadır (Şekil 2.1.) (Benjamin ve ark., 2018). Dünya genelinde 65 yaş altı kişilerde iskemik inme prevalansının 176/100.000, hemorajik inmenin 90/100.00 olduğu, 65 yaş üstü kişilerde ise iskemik inme prevalansının 300/100.000, hemorajik inme prevalansının 116/100.000 olduğu saptanmıştır (Krishnamurthi ve ark., 2015).

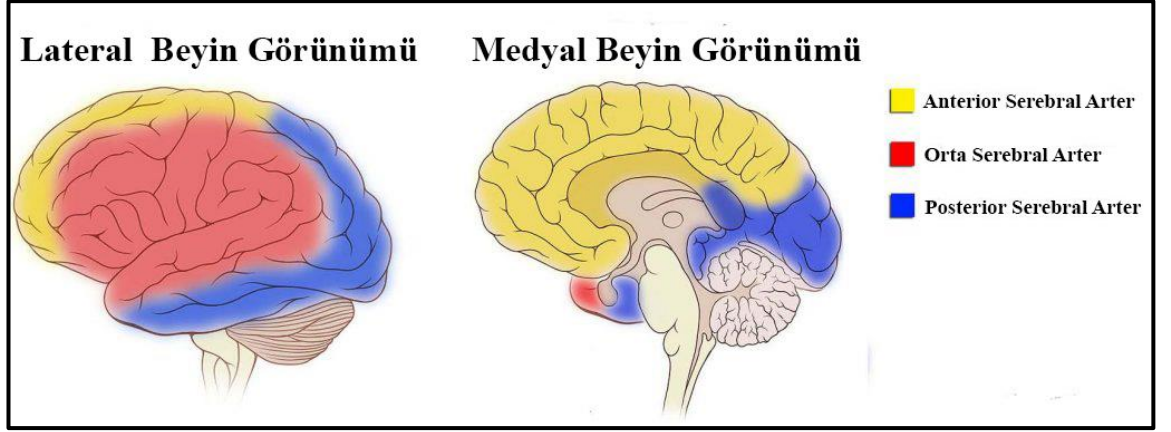


Şekil 2.1. İnme tipleri (Benjamin ve ark., 2018)

İnme kişi, aile ve toplum üzerinde psikososyal ve ekonomik sorunlara da yol açtığından, inmenin tedavisi hem kişi hem de toplum açısından önem arz etmektedir (Kumral, 2011). İnme tedavisindeki asıl amaç, iskemik alandaki perfüzyonu tekrar sağlayarak, iskemi sonrası oluşabilecek ikincil hasarları önleyip vakaların iyileşmesini hızlandıracak ve mortaliteyi azaltacak tedavi yaklaşımlarını ortaya koymaktır (Kumral, 2011; Kablan, 2018). Klinikte serebral iskemi tedavisinde antiagregan, antikoagülan, trombolitik, antiödem ve nöroprotektif ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Saribaş ve ark., 2005).

2.1.2. Serebral Vasküler Anatomi

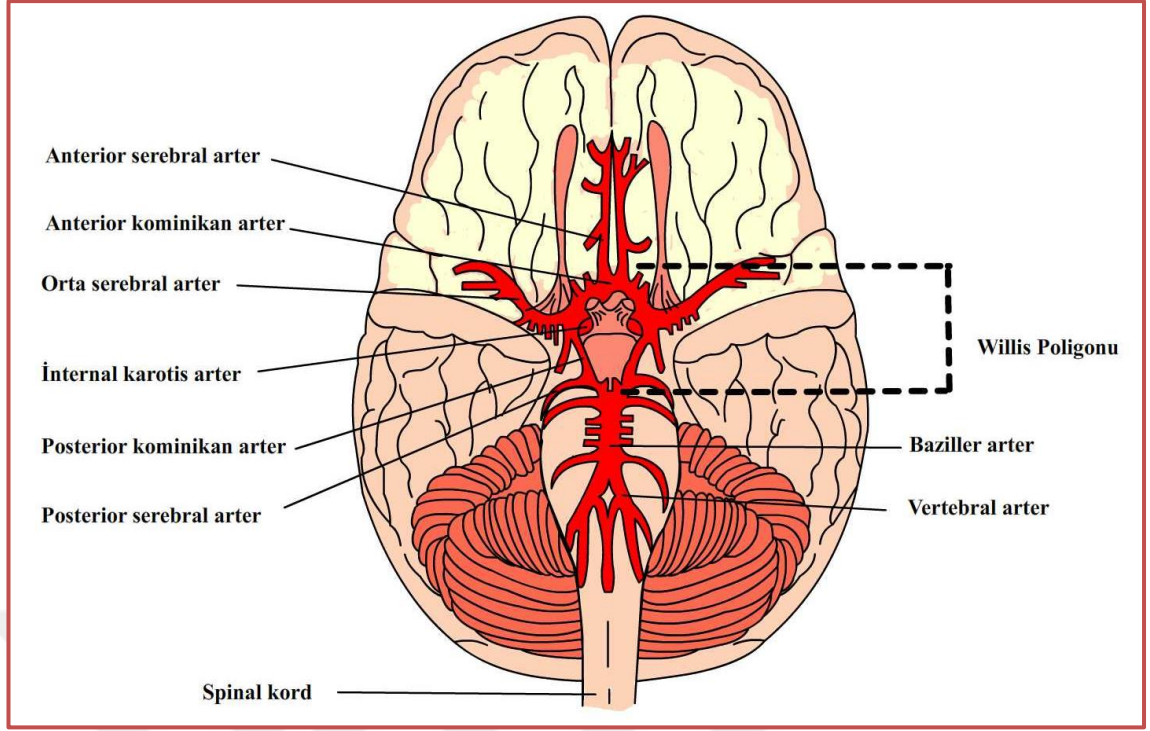
Beynimiz vücudumuzda metabolik olarak en aktif organlarımızdan biridir ve bu aktiviteyi gerçekleştirebilmesi için toplam kalp debisinin yaklaşık % 20'sini kullanmaktadır. Beyin arteriyel kan akımını, ikisi internal karotis arter ve ikisi vertebral arter olmak üzere dört arter aracılığı ile sağlamaktadır (Kumral, 2011). Beyni besleyen arterler, internal karotis arterin ikiye dallanması ile oluşan anterior ve orta serebral arterler ve baziller arterin ikiye dallanması ile de posterior serebral arterlerdir (Şekil 2.2.) (Kumral, 2011). Beyin sapı, serebellum, oksipital lob ve talamusu vertebral arterler ve dalları beslerken, geriye kalan serebral hemisferlerin kan akımını ise karotis internanın dalları beslemektedir (Kumral, 2011).



Şekil 2.2. Beyni besleyen arterler

2.1.3. Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelleri

İnsanlardaki serebral iskemik hastalıklarda yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması için en çok sıçan ve fare gibi kemirgenler üzerinde yapılan global serebral iskemi, fokal serebral iskemi ve ön beyin iskemi modelleri kullanılmaktadır (Tablo 2.2.). Global veya fokal serebral iskemi modelleri deney hayvanlarında arterlerden bir veya birkaçının mekanik ligasyonu veya arter lümeninin bir cisim ile tıkanmasıyla oluşturulmaktadır. Fokal iskemi ile global iskemi arasındaki en önemli fark, global iskemide kollateral akım yokken, fokal iskemide kollateral dolaşım ile iskemik alanın etrafında az da olsa kan akımının mevcut olması ve bu bölgedeki dokuların yaşamlarını belli bir süre devam ettirebilmeleridir (Belov Kirdajova ve ark., 2020). Klinikte en fazla karşılaşılan iskemi tipi, fokal serebral iskemi olup en önemli nedenleri internal karotis arter veya onun en büyük dalı olan orta serebral arterin oklüzyonudur (Gupta ve Briyal, 2004). Deneysel serebral iskemi reperfüzyon modeli olarak en çok iki taraflı karotis arter ve orta serebral arter (OSA) oklüzyonları kullanılmaktadır (Singh ve Chopra, 2013). İnmelerin büyük çoğunluğu internal karotis arterin en büyük dalı olan OSA'nın beslediği beyin bölgesinde gelişmektedir (Şekil 2.3.). Bu bölgede gerçekleşen lezyonların yaklaşık % 33'ü derin orta serebral arterde, % 10'u hem derin hem de yüzeysel dallarda, % 57'si ise sadece yüzeysel dallarda gerçekleşmektedir (Kumral, 2011).



Şekil 2.3. Willis poligonu

Tablo 2.2. Deneysel serebral iske mi hayvan modelleri

Deneysel Serebral İske mi Hayvan Modelleri		
Fokal Serebral İske mi Modelleri	Global Serebral İske mi Modelleri	Ön Beyin İske mis i Modelleri
Kalıcı veya geçici modeller Kalıcı emboli ve tromboz modelleri	Resüsitasyonsuz kardiyak arrest modeli Kardiyak arrest ve resüsitasyon modeli Derin sistemik hipotansiyon modeli Büyük damarların cerrahi tıkanması	İki taraflı AKK tıkanması Dört damar oklüzyon modeli Yüksek tansiyonlu sıçanlarda iki taraflı AKK tıkanması İki taraflı AKK oklüzyonu ile birlikte hipotansiyon oluşturulması

2.1.4. Serebral Kan Akımı (SKA) ve İske mik Alanın Bölgeleri

Serebral Kan Akımı (SKA)

Beyin uyku, uyanıklık, bilişsel ve fiziksel aktiviteler gibi fizyolojik fonksiyonları yerine getirebilmek için yeterli düzeyde oksijene ve enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Erişkin bir insan beyninin ortalama ağırlığı 1350 gram olup, toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sine karşılık gelmesine rağmen, her bir atım ile kalpten fırlatılan kanın % 20'si beyin tarafından kullanılmaktadır (Kaya ve Özdemir, 2011). Fizyolojik koşullarda SKA 45-55 mL/100g/dk'dır ve gri cevherdeki serebral kan akımı ve metabolizma hızı beyaz cevherden 4 kat daha fazladır (Tablo 2.3.). Beynimizdeki enerjinin yaklaşık % 40'ı hücre sel homeostaziste kullanılırken, geriye kalan % 60'lık kısmı da sinaptik

transmisyonunda kullanıldığından SKA'nın % 80 kadarı gri cevheri % 20 kadarı da beyaz cevheri kanlandırmaktadır (Kumral, 2011). Beynimiz vücuttaki toplam oksijenin % 20'sini ve glikozun da % 25'ini tüketmektedir (Kaya ve Özdemir, 2011). Beynin normal fizyolojik koşullarda oksijen metabolizma hızı 1.3-1.8 $\mu\text{mol/g/dk}$ olup, beyindeki hücrelerin ihtiyacına göre bu değer değişkenlik göstermektedir (Astrup, 1982; Siesjö ve Bengtsson, 1989).

Tablo 2.3. Fizyolojik serebral kan değerleri

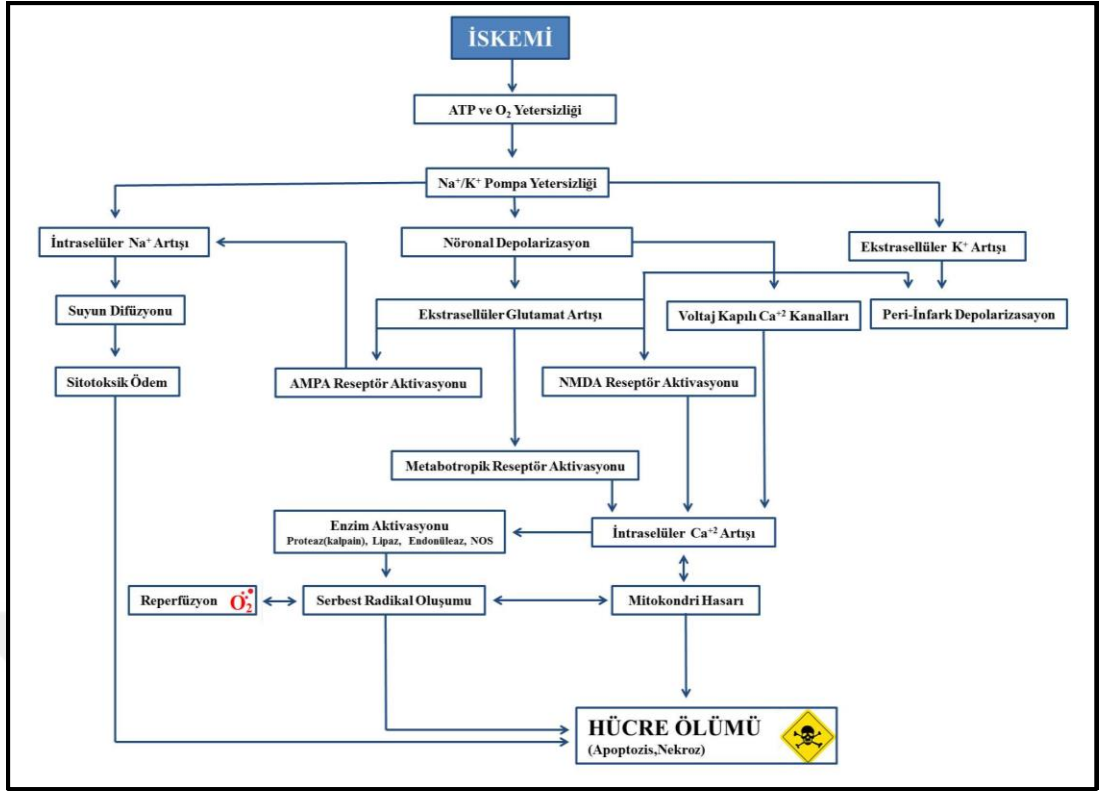
Fizyolojik Serebral Kan Değerleri	
SKA	
Global	45-55 mL/100g/dk
Kortikal(Gri Cevher)	75-80 mL/100g/dk
Subkortikal (Beyaz Cevher)	20 mL/100g/dk
SMHO₂	3-3.5 mL/100g/dk
SVR	1.5-2.1 mm Hg/100g/dk/mL
Serebral Venöz PO₂	32-44 mm Hg
Serebral Venöz SO₂	% 5-70
İKB	8-12 mm Hg
Serebral kan akımı(SKA); Oksijen serebral metabolizma hızı (SMHO ₂); Serebral vasküler rezistans (SVR); Parsiyel oksijen basıncı (PO ₂); Oksijen saturasyonu (SO ₂); İntrakraniyel basınç (İKB).	

Tüm vücudumuzda olduğu gibi beynimizdeki nöronların da birincil enerji kaynağı ATP'dir. Beyindeki nöronlar glikojen depolayamadıkları için sürekli olarak glikoza ihtiyaç duymaktadırlar (Oğul, 2002). Beyin glikozun % 80'ini enerji üretiminde kullanırken % 20'sini nötransmitter, protein ve lipid sentezinde kullanmaktadır (Sahan ve ark., 2010). İskemi ya da hipoksi sonrası mitokondride aerobik solunum durduğundan ve anerobik solunum devam ettiğinden, ilk yanıt anaerobik glikoliz olmaktadır (Berg ve ark., 2002). İnfarkt bölgesinde ATP'nin azalması adenozin monofosfat artışına sebep olmakta ve fosfofruktokinaz enziminin aktive olmasıyla glikojenden ATP üretimi için anaerobik glikoliz devreye girmektedir (Berg ve ark., 2002). Parsiyel oksijen basıncı 0.1 mmHg'nin altına düştüğünde aerobik solunum (36 mol ATP) durarak, anaerobik glikoliz başlayıp 18 kat daha düşük yani 2 mol ATP üretilmektedir (Sims ve Muyderman, 2010). Anaerobik glikoliz ile ATP üretimi en çok 4-5 kat arttırılabildiğinden nöronlar için gerekli enerji karşılanamamaktadır (Yager ve ark., 1992).

Beyinde iskemiye bağlı ATP eksikliği, Na⁺-K⁺ pompa aktivitesinin ve iyon dengesinin bozulmasına, membran potansiyelinin değişmesine, nöronlarla glial hücrelerin depolarize olmasına ve nöronlardan nörotransmitterlerin salınmasına neden olmaktadır

(Oğul, 2002). ATP bağımlı $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompasının yetersizliği hücre içine sodyum, hücre dışına potasyum geçişine ve aynı zamanda izoozmotik su birikimi ile hücresel şişmeye neden olmaktadır (Oğul, 2002). Glikoz, anaerobik glikoliz ile laktata metabolize olmakta, laktik asit ve hidrojen iyonu birikmekte ve bu da pH'ı düşürerek hücrenin asidoza gitmesine neden olup serbest radikal üretimi artmaktadır (Zhang ve ark., 2005; Simard ve ark., 2007; Kumral, 2011). Sonuç olarak, geri dönüşümsüz hasar süreci başlamakta, kan beyin bariyeri bozularak iskemiden dakikalar/saatler sonra sitotoksik ödem ve 24-72 saat sonra vazojenik ödem başlayarak hücre ölümü gerçekleşmektedir (Bogousslavsky ve ark., 1988; Simard ve ark., 2007).

İskemiye takiben dakikalar içerisinde presinaptik uçtaki akson terminallerinden ekstrasellüler aralığa aşırı miktarda glutamat gibi eksitatör aminoasitlerin salınımı artmakta ve geri alımı bozularak postsinaptik reseptörlerine bağlanan eksitatör aminoasitler hücre içine aşırı kalsiyum girişine neden olmaktadır (Liang ve ark., 2004; Shalak ve Perlman, 2004; Xing ve ark., 2012). Sinaptik aralıkta artan glutamat, postsinaptik glutamat reseptörlerini, özellikle NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına sebep olur (Xing ve ark., 2012). NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu daha fazla kalsiyum iyonlarını hücre içine alarak proteaz, nükleaz, kaspaz gibi enzimleri aktive ederek postsinaptik kısımda nöron ölümünü gerçekleştirir (Xing ve ark., 2012). Kalsiyum-bağımlı enzimler hücre ve dokuda protein yıkımına, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit oluşumuna sebep olur (Şekil 2.4.) (Oğul, 2002).



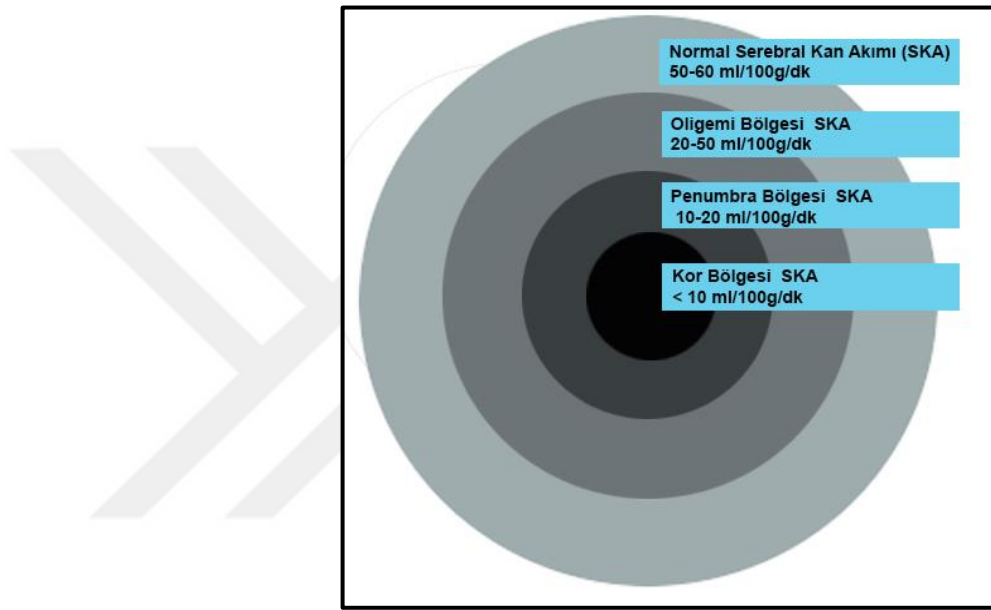
Şekil 2.4. İskemik hasarın oluş mekanizmaları

İskemik Alanın Bölgeleri

İskemik inme, beyni besleyen damarların bir bölümünün veya tamamının tıkanması sonucu oluşmaktadır. İskemik alan üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Birinci bölge, kan akımının 10 mL/100g/dk'nın altına düştüğü ve iskemik bölgenin merkezini oluşturan “kor” bölgesidir (Kumral, 2011). İskeminin kor bölgesinde ATP eksikliği ile kaspazlar inaktive olurken hücre iyon dengesi bozulmakta, bol miktarda NO ve serbest radikaller üretilmektedir (Chan, 1996; Simonian ve Coyle, 1996; Nicotera ve Lipton, 1999; Yamashima, 2000). Bunun yanı sıra kor bölgesinde glutamat, sitotoksik sitokinler gibi eksitotoksinler aşırı miktarda artmakta (Hillered ve ark., 1989; Davalos ve ark., 2000), sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişi ile birlikte klorun hücre dışına çıkışı nöronal hücrelerde ve dendritte nekroz oluşturmaktadır (Lee ve ark., 2000). Bu süreç iskemiden hemen sonra başlamakta ve yaklaşık olarak 5 gün sürmektedir (Yamashima ve ark., 2003). Kan akımının nerede çok düşük olduğu bu alanda hücrelerde geri dönüşümsüz hasar, nekroz ve hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Kor bölgesinin yakın çevresini oluşturan ve “Penumbra” bölgesi olarak adlandırılan ikinci bölgede ise serebral kan akımı (SKA) 10-20 mL/100g/dk civarındadır (Kumral, 2011). Penumbra alanında gözlenen apoptozis, aktif ve enerji bağımlı bir süreçtir. Penumbra alanında kan akımının azalması ve elektriksel potansiyellerin oluşmamasına

rağmen hücreler membran potansiyellerini ve iyon dengesini koruyabilmektedirler (Memezawa ve ark., 1992). Bu nedenle penumbra alanındaki hücreler yaklaşık 4-6 saat canlılığını sürdürebilmektedirler (Davalos ve ark., 2000). Bu bölgede reperfüzyonun tekrar sağlanması ile kalıcı hasar önlenemekte, eğer kısa sürede bu bölgeye kan akımı tekrar yeterli düzeyde sağlanamaz ise penumbra bölgesinde de geri dönüşümsüz hasar gerçekleşip iskemik alanın kor bölgesine dönüşerek nekroz gerçekleşmektedir (Davalos ve ark., 2000). Bundan dolayı inme vakalarının tedavisinde asıl amaç penumbra alanını kurtarmaya yönelik protokollerin geliştirilmesidir.



Şekil 2.5. İskemik alanın bölgeleri

Üçüncü bölge ise “Oligemi” bölgesidir ve kan akımı 20-50 mL/100g/dk’dır (Kumral, 2011). Oligemi bölgesi, kan akımının normalin altında olup infarkt riskinin olmadığı penumbranın çevresindeki alandır (Salford ve ark., 1973).

İskemi sonrası nörolojik ve fonksiyonel iyileşmelerin özellikle ilk haftalarda olduğu ve bu iyileşmenin penumbra alanının geri kazanılması ile olduğu bilinmektedir (Kumral, 2011). İskemi sonrası kor bölgesinde hücre ölümü penumbra bölgesine göre daha hızlı gerçekleşir, çünkü eksitotoksik ajanlar (glutamat ve kalsiyum), serbest radikaller ve apoptotik yollar doku hasarına yol açmaktadır (Kumral, 2011; Belov Kirdajova ve ark., 2020).

İskemiden dokunun nasıl etkileneceği, hücre hasarının geri dönüşümünün olup olmayacağı yani hücrenin apoptozise mi yoksa nekroza mı uğrayacağı, iskeminin süresine, şiddetine ve kollateral kan akımına bağlıdır (Ghosh ve ark., 2013). Serebral

kan akımı eğer 5 mL/100g/dk olduğunda infarkt 30 dakika sonra meydana gelmekte, 10 mL/100g/dk olduğunda 3 saat sonra, 15 mL/100g/dk olunca 3.5 saat sonra, 18 mL/100g/dk olduğunda ise 4 saat sonra infarkt meydana gelmektedir (Bouma ve ark., 1992). Serebral kan akımının oligemik düzey olan 20-50 mL/100g/dk'da olduğunda ise infarkt gelişmeden hücresel fonksiyonlar uzun süre devam edebilmektedir (Salford ve ark., 1973; Kumral, 2011). Eğer oligemik bölgede reperfüzyon hızlı bir şekilde tekrar sağlanırsa infarkt alanın azalması mümkün olmaktadır (Salford ve ark., 1973). Arteriyal kan basıncındaki ani azalma iskemik penumbra alanının hızla iskemik kor bölgesine dönüşmesine yol açmaktadır (Suarez, 2006). Serebral kan akımında oluşan azalmaların hücrelerde meydana getirdiği hasarın boyutu Tablo 2.4.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Patolojik serebral kan akımı değerleri

Patolojik Serebral Kan Akımı Değerleri	
45-55 mL/100g/dk	Normal koşullar
20 mL/100g/dk	Bilinç kaybı, EEG dalgalarında azalma
18 mL/100g/dk	İyonik hemostaziste bozulma ve nöronlarda anerobik yaşam
10 mL/100g/dk	Hücre membran bütünlüğünün tamamen bozulması, Ca^{+2} hücre içine girişi, geri dönüşümsüz hücre hasarı

İskemiden sonra serebral kan akımının azalmasına bağlı olarak oksijen eksikliği ile beraber 10 sn içerisinde önce kişide bilinç kaybı, 2-4 dakika içerisinde de glikoz eksikliği görüldüğü bilinmektedir (Li ve ark., 2011; Yuan ve ark., 2012; Belov Kirdajova ve ark., 2020). Bu süreci takiben 5-6 dakikada ATP azalmaya başlamakta ve enerjinin yaklaşık %50'si ile %75'i tükendiğinden, iyon pompaları işlev göremez hâle gelmekte, hücre içine sodyum ve kalsiyum girişi, hücre dışına potasyum çıkışı gerçekleşmektedir (Li ve ark., 2011; Yuan ve ark., 2012). İskeminin şiddetine bağlı olarak 6.-8. dakikalarda iskeminin kor bölgesinde kalıcı nöronal hasar başlamakta iken penumbra bölgesinde ise nöronlar canlılığını sürdürmektedir (Belov Kirdajova ve ark., 2020).

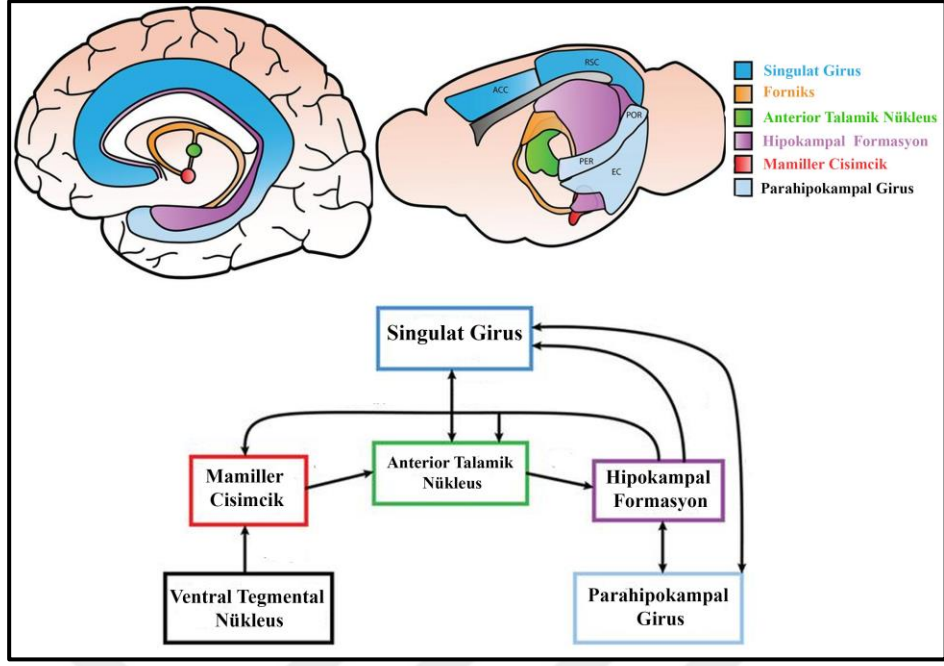
2.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

İskeminin sonlanarak reperfüzyon ile kan akımının tekrar sağlanması, iskemik bölgeye daha fazla hasar vermektedir. Bu hasara “Reperfüzyon Hasarı” denilmekte ve hasarın şiddetini iskeminin süresi belirlemektedir (Zhang ve ark., 2005). Perfüzyonun tekrar sağlanması hücre içerisine moleküler oksijen girişine yol açarak serbest radikal üretiminin hızlı artışına neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2005). Fizyolojik koşullar

altında antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasında denge söz konusudur fakat hipoksi, iskemi gibi durumlarda serbest radikaller çok hızlı arttığından artık antioksidanlar tarafından dengelenemez hâle gelmektedir (Valko ve ark., 2005). Artan serbest radikaller lipid, protein, ve nükleik asitlerin yapısını bozarak doğrudan nöron hasarına yol açtığı gibi beyinde apoptotik, nekrotik ve ekzitotoksik yolları aktifleştirerek de hücre ölümüne yol açmaktadır (Ward ve ark., 1985; Xiong, 2006). Sivenius ve ark. (Sivenius ve ark., 2004) gecikmiş reperfüzyonun beyin dokusunda iskemiden daha fazla hasara neden olduğunu rapor etmişlerdir. İskemi/reperfüzyon hasarının, iskeminin 2.-6. saatinde başlayıp reperfüzyonun 24. saatinde en yüksek seviyeye ulaştığı bilinmektedir (Gasche ve ark., 1999). İskemi esnasında oksijen ve glukoz eksikliğine bağlı olarak nöronlarda ATP seviyeleri yani enerji düzeyi önemli ölçüde düşer ve iyonik denge bozulur (Xing ve ark., 2012). İlk defa 1981 yılında Granger ve ark. (Granger ve ark., 1981) tarafından iskemi sonrası perfüzyonun tekrar sağlanması aşamasında serbest radikallerin oluştuğu ortaya atılmıştır. Perfüzyondan sonra artan serbest radikallerin doku hasarına yol açmanın yanı sıra hücrel Ca^{+2} homeostazisini de bozarak sitozolik ve mitokondriyel Ca^{+2} artışına neden olduğu bilinmektedir. Bu durum mitokondriyel hasara sebep olup, hücreyi ölüme götüren enzim yollarını aktifleştirerek geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açıp hücrenin ölümü ile sonuçlanmaktadır (Wyatt, 2002; Perlman, 2006).

2.2. Hipokampus

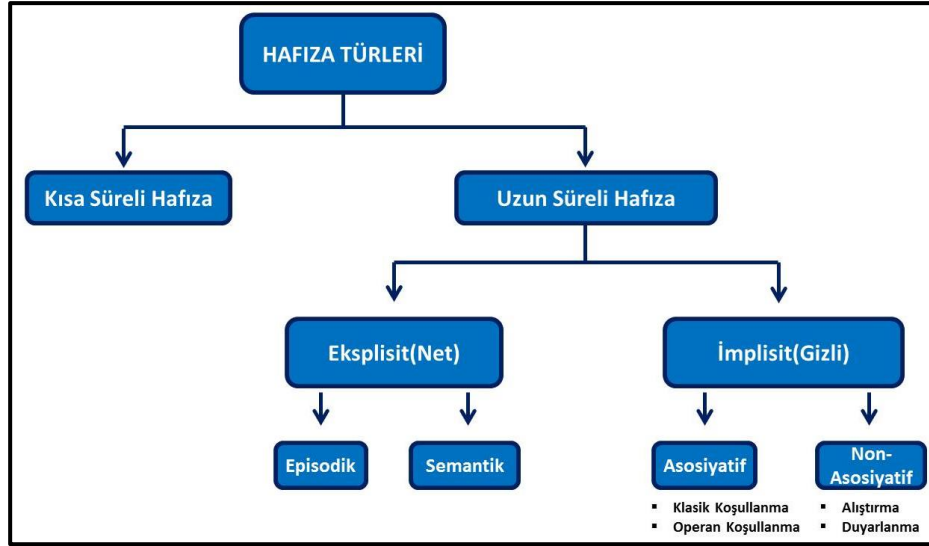
Hipokampus temporal lobun medialinde bulunmakta ve denizatına benzerliğinden dolayı Yunanca hippos=at ve kampos=deniz kelimelerinden oluşmaktadır (Barr ve Klernam, 1988; Amaral ve Insausti, 1990). Dış yüzünün koç boynuzunu anımsatması nedeniyle koç başlı Mısır Tanrısına verilen “Cornu Ammonis” (CA) adı ile de anılmaktadır. Hipokampus CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört bölümden oluşur (Amaral ve Insausti, 1990). Hipokampusun CA1 bölgesi öğrenme, uzaysal hafıza ve referans hafızanın temelini oluşturan CA1-CA3 bağlantısından sorumludur (Şekil 2.6.).



Şekil 2.7. Papez devresi (Escobar ve ark., 2019)

Hafıza, genellikle depolanan bilginin türüne göre ekplisit-deklaratif (açık, net) ve implisit (gizli) hafıza şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Squire ve Zola, 1998) (Şekil 2.8.). Ekplisit-deklaratif (açık, net-bildirim belleği) hafıza, olayın ne zaman, nerede, nasıl gerçekleştiği, yeni bilgilerin öğrenilerek kodlanıp güçlenmesi ve eski bilgilerle ilişkilendirip bilgilerin geri çağırılması aşamasındaki bilgileri içermektedir (Schacter ve ark., 2011; Hall, 2017). İmplisit hafıza motor beceriler olarak bilinen ve bir kez kazandıktan sonra otomatik hâle gelen beceri ve alışkanlıkları içermektedir. Bedensel motor beceri olan implisit hafıza, karşıdan gelen bir tenis topuna vurma olayı boyunca geliştirilen tüm becerileri kapsamaktadır. Yani, topun geliş yönünü ve hızını görüp, top ile raketi ilişkilendirerek el, kol, bacak, beden ve raket hareketlerini uygun pozisyona alarak topu karşılama esnasında zihnimizde çok hızlı yapıp hemen bir sonraki hamleye geçip gerçekleştirilen eylemdir (Hall, 2017).

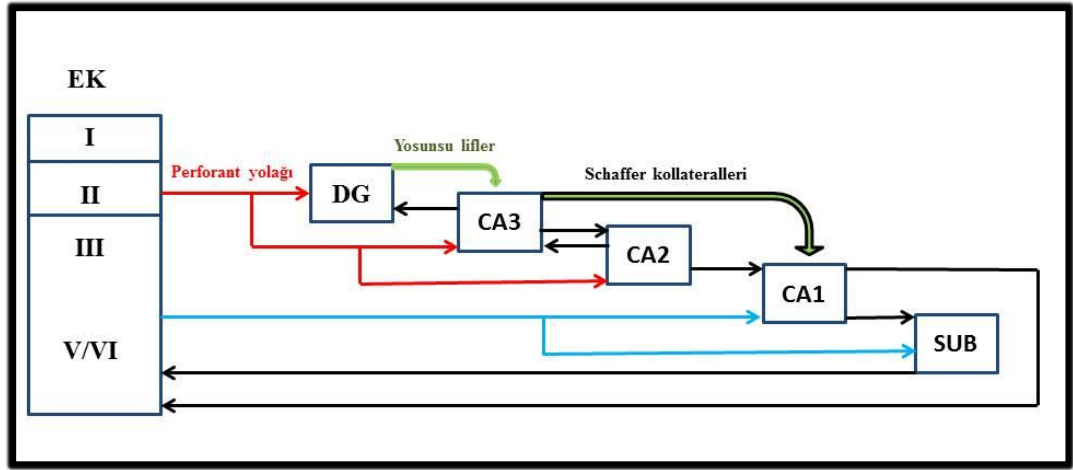
Ekplisit hafızanın oluşması için dört aşama gerekmektedir; kodlama, pekiştirme, depolama ve geri çağırma. Yeni bilginin işlenip hafızaya alınmasına “kodlama” denilmektedir (Hall, 2017). Pekiştirme, bu yeni bilginin daha uzun süreli saklanabilmesi için yapılan işlemidir. Pekiştirilen bilginin uzun süre boyunca saklanması işlemi depolama olarak adlandırılır (Hall, 2017). Depolanan bilgilerin tekrar kullanılmak için hatırlanıp çağırılması işlemine “geri çağırma” denmektedir (Hall, 2017).



Şekil 2.8. Hafıza türleri

Hipokampusu hasarlanmış kişilerde yeni bilgilerin öğrenilmediği fakat eski bilgilerin geri çağrılmasının güç de olsa sağlandığı görülmüş olup, bu durum hipokampusun kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüşmesinden ve bilginin depolanmasından sorumlu olduğunu ispat etmektedir. (Kitamura ve Inokuchi, 2014; Tanaka ve ark., 2014).

Hipokampusta bilgilerin işlenmesi aşamasında hipokampusun tüm bölgeleri görev almaktadır. Nöronal bilgiler, entorinal korteksteki (EK) perforant yolağında bulunan glutamaterjik nöronlar üzerinden dentat girusun (DG) granüler hücrelerine bağlantı yaparak kurulmaktadır (Şekil 2.9). Perforant yolağı EK aksonları ile CA4 dışında hipokampusun tüm bölgeleri (CA1,CA2,CA3) ile bağlantı yapmaktadır. DG granüler hücrelerinin akson uçları yosunsu lifler aracılığıyla CA3'ün piramidal hücrelerine güçlü bağlantılar gerçekleştirmektedir. CA3 piramidal nöronlarının aksonları ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine bağlantı schaffer kollateralleri ile sağlanmaktadır (Wojtowicz, 2012). Ayrıca CA1'e CA3 dışında EK'den de bağlantıların olduğu bilinmekte ve bu yolla CA1'e hem CA3 hem de EK'den bilgi girişi olmaktadır. Beynin çeşitli bölgelerinden hipokampusa gelen bilgi, EK üzerinden giriş yaparak işlenip ve güçlendirilmek üzere EK'e geri dönmektedir (Wojtowicz, 2012). Yeni bilgilerin oluşması ve kodlanması önce EK'den DG ve daha sonra DG'den yosunsu lifler aracılığıyla CA3 ile bağlantılar kurularak oluşmaktadır. Var olan eski bilgilerin geri çağrılması ise EK'den DG'ye uğramadan perforant yolak ile CA3 ve CA1 üzerinden bağlantılar yapılarak gerçekleşmektedir (Bakker ve ark., 2008).



Şekil 2.9. Hipokampal oluşum

Hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal ve dentat granül hücreleri ile neokorteksin III., V. ve VI. tabakalarındaki nöronlar, striatumdaki küçük nöronlar ile serebral korteksin hücresel IV. tabakası, serebellar purkinje hücreleri ve neostriatumdaki küçük ve orta boyutlu nöronları iskemik hasara karşı duyarlı diğer yapılardır (Kuraiwa ve ark., 1990; Eliasson ve ark., 1997; Harukuni ve Bhardwaj, 2006). Bu nöronların nörotransmitter salgılayan sinir uçları da iskemeye karşı savunmasız alanlardır ve nöronların çevresi korunsun bile kendileri nekroza uğramaktadırlar (Weinberger ve ark., 1983; Eliasson ve ark., 1997; Smith, 2004). Hipokampusun CA1 bölgesi anoksi ve iskemiyeye en duyarlı kısımdır (Smith, 2004). Hipokampusun inferior bölümünde yer alan CA2 ve CA3 bölgeleri anoksiye karşı dirençli alanlar olarak bilinmekte ve CA4 alanı ise hipoksiye karşı orta derecede duyarlı olup hipokampus ile dentat girus arasında yer almaktadır (Smith, 2004).

Hipoksi veya iske mi (global veya fokal), özellikle hipokampus, striatum ve prefrontal kortekste kapsamlı (geniş) ve ilerleyici fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Choi, 1994b). Gecikmiş nöron ölümünün patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz anlaşılmamış olsa da, bu sürecin glutamat ve aspartat aracılı eksitotoksiste kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Chen ve ark., 2005). Geçici serebral iske mi, hipokampusta glutamat ve aspartat salınımına yol açmakta, postsinaptik glutamat reseptörlerinin (NMDA ve AMPA) aşırı uyarımı ile sonuçlanmaktadır (Chen ve ark., 2005).

2.3. Glutamat

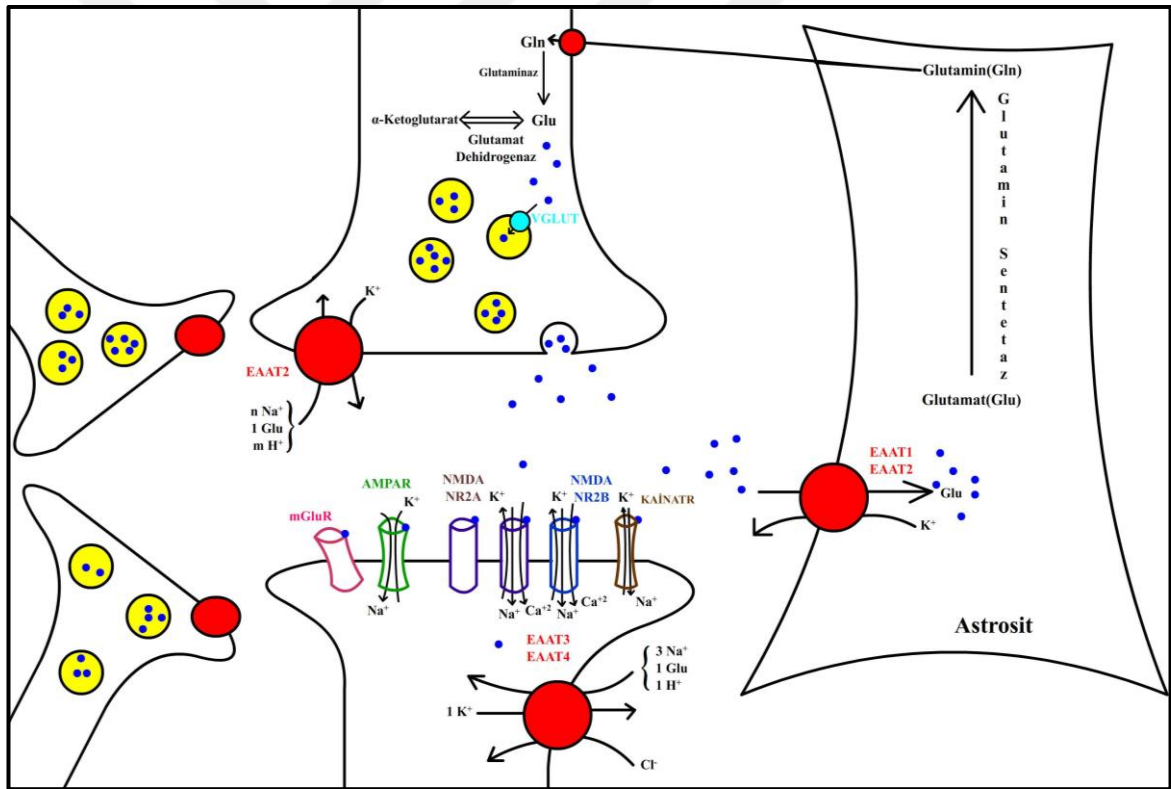
Glutamat öğrenme, hafıza, nöron gelişimi ve sinaptik bağlantıların güçlenmesi gibi çok önemli fizyolojik olaylarda kritik rol oynamaktadır (Liang ve ark., 2004; Swanson ve

ark., 2004). Tüm beyinde ortalama glutamat düzeyi yaklaşık 5-15 mmol/kg'dır (beyin bölgesine bağlı olarak değişmekte), ancak glutamatın sadece küçük bir kısmı sinaptik aralığa salınmaktadır (Krzyzanowska ve ark., 2014). Glutamatın neredeyse % 99.99'u (1-10 mmol/L) hücre içerisinde yani sinir terminallerindeki sinaptik veziküllerde (yaklaşık 100 mmol/L) bulunurken, hücre dışı glutamat konsantrasyonu sadece birkaç μ mol/L'dir (Krzyzanowska ve ark., 2014). Sinaptik aralıktaki glutamat reseptörlerine bağlanmakta veya glutamat taşıyıcıları aracılığıyla geri alınmakta ve bu sayede sinaptik aralıkta glutamat dengesi sağlanmaktadır (Yin ve ark., 1998; Maragakis ve Rothstein, 2001). Eğer bu denge sağlanamaz ve glutamat artışı olursa bu durum glutamat nörotoksitesi ile sonuçlanarak hücreyi ölüme götürmektedir (Yin ve ark., 1998; Maragakis ve Rothstein, 2001).

İskemi gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta glutamat düzeyinde ve glutamat reseptör aktivitesindeki artışın nöronal hücre hasarına ve ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Victor ve Ropper, 2001; Oğul, 2002). İskemik hasar, bir taraftan glutamatın salınımını arttırmakta diğer taraftan da enerji bağımlı presinaptik glutamat geri alım mekanizmalarının bozulması sonucu ekstrasellüler aralıkta yüksek miktarda glutamat birikmesine neden olmaktadır (Kutluk, 2004; Liang ve ark., 2004). İskemi anında oluşan bu durum "Glutamat Eksitotositesi" olarak adlandırılmaktadır. İskemik beyinde, ATP eksikliğinden dolayı Na^+-K^+ pompa aktivitesi bozulmakta, membran potansiyeli değişmekte, nöronlarla glial hücreler depolarize olmakta ve nöronlardan nörotransmitterler salınmaktadır (Kutluk, 2004). Bunun sonucunda dakikalar içerisinde presinaptik uçtan ekstrasellüler aralığa aşırı miktarda glutamat salınımı (Kutluk, 2004; Liang ve ark., 2004) ve enerji bağımlı glutamat taşıyıcılarının çalışmaması nedeniyle sinaptik aralıkta glutamat birikmesine neden olmaktadır (Kristian ve Siesjo, 1996).

Glutamat krebs döngüsünde alfa ketoglutaratın transaminasyonu yoluyla glikozdan ve glutaminaz enzimi aracılığıyla da glutaminden olmak üzere iki farklı yoldan sentezlenmektedir (Danbolt, 2001) (Şekil 2.10). Presinaptik sinir terminallerinde sentezlenen glutamat, VGLUT aracılığıyla veziküllerin içine alınmakta ve depolanmaktadır. Beyin dokusunda VGLUT-1, VGLUT-2 ve VGLUT-3 olmak üzere 3 farklı vezikül taşıyıcısı bulunmaktadır (Danbolt, 2001). VGLUT1 ve VGLUT2 özellikle glutamaterjik presinaptik terminallerde eksprese edilirken, VGLUT3 glutamaterjik ve nonglutamaterjik nöronların soma, dendrit ve astrositlerinde eksprese edilmektedir (Danbolt, 2001). VGLUT1 serebral, serebellar korteks ve hipokampusta

yoğun şekilde ekspres edilirken, VGLUT2 ise subkortikal nöronlarda ekspres edilmektedir (Danbolt, 2001). Merkezi sinir sisteminde toplam veziküler glutamat alımının yaklaşık % 80'ini VGLUT1 sağlamaktadır (Benarroch, 2010). Farelerde yapılan çalışmada iskemi sonrası artan glutamat düzeyini azaltmak için iskemik hasarın 7. gününde VGLUT1 ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (Hu ve ark., 2017; Miller ve ark., 2017). Presinaptik membrana gelen yüksek frekanslı (100 Hz) bir uyarı, nöronun eksitasyonuna yol açıp glutamatın sinaptik aralığa dökülmesine ve glutamatın postsinaptik membranda bulunan reseptörlerine bağlanarak hücresel cevap oluşturmaya neden olmaktadır (Danbolt, 2001). Sinaptik aralıkta fazla miktarda glutamat bulunması postsinaptik nöronun aşırı uyarılmasına, hücre içi Ca^{+2} artmasına ve nörotoksositeye yol açmaktadır (Danbolt, 2001). Bu nedenle sinaptik aralıkta bulunan fazla glutamat, hem nöronlarda hem de glialarda bulunan eksitator aminoasit taşıyıcıları (EAAT) tarafından hücre içine alınmaktadır (Danbolt, 2001).



Şekil 2.10. Glutamat-Glutamin döngüsü (Danbolt, 2001)

Beyinde yapılarına, enzimatik özelliklerine ve lokalizasyonlarına göre EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, EAAT-4 ve EAAT-5 bulunmaktadır (Tablo 2.5.) (Şekil 2.10) (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT-1, glutamati hücre dışından astrositlere taşıyarak ekstrasellüler glutamat seviyesinin düzenlenmesinden sorumlu temel protein olarak rol oynamaktadır (Sato ve ark., 1999; Danbolt, 2001). EAAT1'in hipokampusun CA1

bölgesinde yoğun olduğu ve çoğunlukla astrositlerde eksprese edildiği bilinmektedir (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT2, EAAT1'in bol olduğu beyin bölgeleri hariç tüm bölgelerde en bol bulunan glutamat taşıyıcısıdır ve ön beyindeki glutamat alımının % 90-95'inden sorumludur (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT2 ağırlıklı olarak astrositlerde eksprese edilmekte, ancak EAAT2'nin % 10 kadarı hipokampustaki presinaptik nöron terminallerinde eksprese edilmektedir (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT3 hipokampus, beyincik ve bazal gangliyonlardaki nöronlarda yüksek konsantrasyonda eksprese edilmesine rağmen, bu bölgelerdeki ekspresyon seviyeleri EAAT1 ve EAAT2'den 100 kat daha azdır (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT3 ağırlıklı olarak dendritlerde ve somada eksprese edilmekte, bu da sinaptik iletimi doğrudan düzenlemek yerine homeostatik veya hücre metabolizmasında rol oynadığını göstermektedir (Vandenberg ve Ryan, 2013). EAAT4 ekspresyonu sınırlı olup, çoğu serebellumun purkinje hücrelerinde bulunmaktadır. EAAT5 ise sadece retinada eksprese edilmekte olup, hem konilerin ve rodların terminallerinde hem de rodlarla bağlantılı bipolar hücrelerin akson terminallerinde tanımlanmıştır (Vandenberg ve Ryan, 2013). Glutamat taşıyıcılarının kronik inhibisyonu, sinaptik glutamatın daha yavaş temizlenmesine yol açmakta ve postsinaptik nöronal hasarı arttırmaktadır (Vandenberg ve Ryan, 2013).

Tablo 2.5. Eksitator aminoasit taşıyıcıları (Vandenberg ve Ryan, 2013)

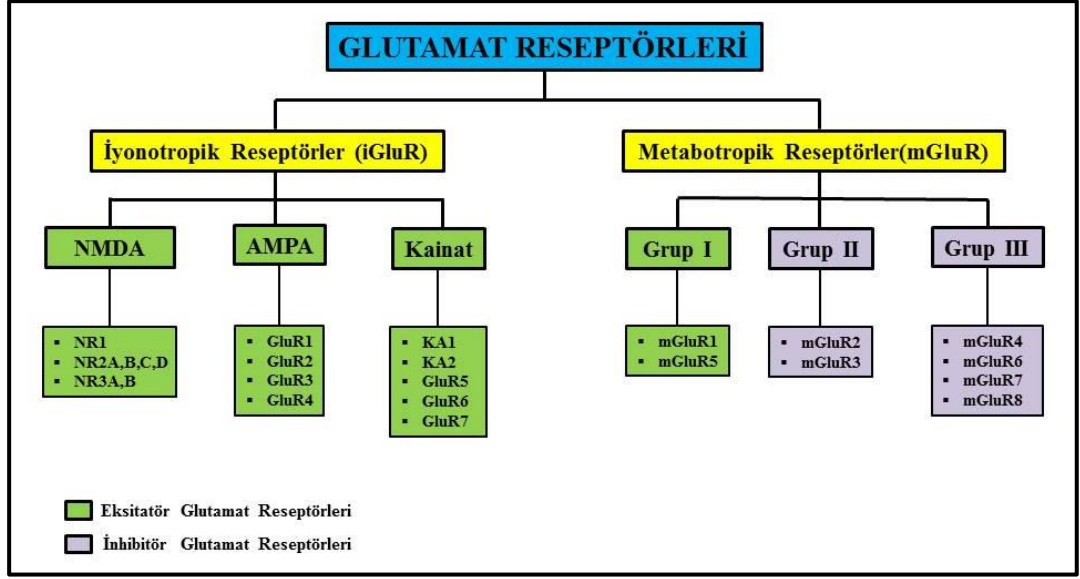
Glutamat Taşıyıcıları	İnsan Homolojileri	Hücre Tipi	Dağılımı
GLAST	EAAT1	Astrosit	Serebellum, beyin, spinal kord
GLT1	EAAT2	Astrosit	Tüm beyin ve spinal kord
EAAC1	EAAT3	Nöron	Hipokampus, serebellum, bazal gangliyon
EAAT4	EAAT4	Nöron	Serebellumun purkinje hücreleri
EAAT5	EAAT5	Nöron	Retina

Chen ve ark. (Chen ve ark., 2005) sıçanlarda 20 dakikalık geçici global iskemi modeli oluşturmuşlar ve hipokampusun CA1 bölgesinde EAAT1 ve EAAT3 protein düzeylerinin iskeminin 3. ve 7. günlerde arttığını, EAAT2'nin ise özellikle 7. günde azaldığını göstermişlerdir. Bruhn ve ark. (Bruhn ve ark., 2000) ise sıçanlarda yaptıkları geçici serebral iskemi çalışmasında iskemi sonrası 1., 2., 4. ve 21. günlerinde hipokampal CA1 ve CA3 alanlarının farklı bölgelerinde EAAT2'nin mRNA ekspresyon azaldığını ve özellikle CA1 bölgesinde 4. günden itibaren daha fazla azalma olduğunu, CA3 bölgesindeki azalmaların ise CA1 bölgesine göre daha az olduğunu

bildirilmişlerdir. EAAT3 endojen antioksidan olan glutatyonun sentezi için gerekli olan sistein substratını taşımaktadır (Li ve Zuo, 2011). EAAT3 geni susturulmuş hücrelerde glutatyon seviyelerinde azalmanın olduğu ve buna bağlı olarak oksidanlara karşı savunmasız kalındığı gösterilmiştir (Aoyama ve ark., 2006). Li ve ark. (Li ve Zuo, 2011) EAAT3 knockout farelerde 90 dakikalık orta serebral arter oklüzyon modelini kullanarak iskeminin 7.gününde infarkt alanının ve nörolojik bozukluğun daha fazla olduğunu ve EAAT3 knockout iskemik farelerde oksidatif stresin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Hem nöronlarda hem de glial hücrelerde glutamat taşıyıcıları olmasına rağmen genellikle astrositlerin alım kapasitesinin nöronlardan daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Neves ve ark., 2018). Astrositlere geri alınan glutamat glial spesifik enzim olan glutamin sentetaz aracılığıyla glutamine dönüştürülmektedir (Neves ve ark., 2018). Daha sonra glutamin nöronlarda ve astrositlerde bulunan farklı glutamin taşıyıcıları aracılığıyla nörona taşınmakta ve burada fosfat ile aktive olan glutaminaz enzimi yardımıyla tekrar glutamata dönüşmektedir (Neves ve ark., 2018). Böylece glutamatın prekürsörü olarak görev yapan glutamin, glutamatın nöronlardan tekrar salınmasına aracılık etmektedir (Neves ve ark., 2018).

Sinaptik aralığa dökülen glutamat metabotropik reseptörleri veya iyonotropik reseptörleri (NMDA, AMPA ve Kainat) üzerinden etkilerini göstermektedir (Akıns ve Atkinson, 2002; Hoyte ve ark., 2004) (Şekil 2.11.). Metabotropik glutamat reseptörleri G-protein bağlı reseptörlerdir ve etkilerini ikincil haberciler üzerinden göstermektedirler. Bu reseptörler, kullandıkları G proteinlerine bağlı olarak üç kategoriye ayrılır; grup I eksitör, grup II ve III inhibitör reseptörler olarak görev yapmaktadır (Kannampalli ve Sengupta, 2015). İyonotropik glutamat reseptörü olan NMDA reseptörünün özellikle hipokampusun CA1 bölgesinde ve talamus, striatum, serebellum, korteksin 3., 5. ve 6. tabakalarında fazla bulunduğu bilinmektedir (Rea ve ark., 2007). NMDA reseptörünün NMDAR1, NMDAR2 ve NMDAR3 olmak üzere alt tipleri vardır. NMDAR2'nin de NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C ve NMDAR2D olmak üzere 4 alt tipi mevcuttur (Danbolt, 2001). Yetişkin hipokampusunda hem NMDAR2A hem de NMDAR2B çok fazla bulunmaktadır. Ayrıca NMDA tipi glutamat reseptörleri hem iskemik nöronal hasar hem de iskemik toleransla ilişkili olup, iskemi sonrası NMDAR1, NMDAR2A ve NMDAR2B reseptörlerinin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2006; Chen ve ark., 2008; Hu ve ark., 2017).



Şekil 2.11. Glutamat reseptörleri

AMPA reseptörlerinin merkezî sinir sisteminde bulunan eksitator sinapslarda hızlı sinaptik iletme aracılık ettiği ve 4 tane alt birimden (GluR1-GluR4) oluşan heteromerik bir kompleks olduğu bilinmektedir (Danbolt, 2001). AMPA reseptörünün hipokampusun piramidal hücreleri, striatum, amigdala ve korteksin derin tabakalarında daha fazla bulunduğu bilinmektedir (Mishra ve ark., 2001). NMDA dinlenim membran potansiyelinde (-70 mV) Mg^{+2} blokajı altında kapalı olan, hem kimyasal (ligand kapılı) hem de voltaj bağımlı bir reseptördür (Belov Kirdajova ve ark., 2020). AMPA ve kainat reseptörleri glutamatın bağlanması ile hızlı şekilde depolarize olarak, yavaş depolarize olan NMDA'nın çalışmasına katkı sağlamaktadır (Belov Kirdajova ve ark., 2020). AMPA reseptörünün depolarizasyonu NMDA reseptöründen Mg^{+2} blokajının kalkmasını (yaklaşık olarak membran potansiyeli -30 mV) sağlamaktadır (Belov Kirdajova ve ark., 2020). Kainat ve AMPA reseptörleri Na^{+} ve K^{+} geçişine izin verirken NMDA reseptörü bu iyonların dışında Ca^{+2} iyonunun geçişine de izin vermektedir (Rea ve ark., 2007). NMDA reseptörü diğer iyonik reseptörlere göre Ca^{+2} iyonuna 5 kat daha geçirgendir (Belov Kirdajova ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda iskemik hasarın AMPA ve kainat reseptör aktivasyonundan ziyade Ca^{+2} 'dan dolayı NMDA reseptör aktivasyonuna bağımlı olduğu gösterilmiştir (Bond ve ark., 1999; Grabb ve Choi, 1999). Eğer NMDA reseptörünün aktivasyonu uzun süre devam ederse iskemik penumbra bölgesi iskemik kor bölgesine dönüşerek daha fazla alanın infarkt olmasına sebep olmaktadır (Oğul, 2002). Penumbra bölgesindeki nöronal depolarizasyonlar Ca^{+2} birikmesine, kor bölgesindeki K^{+} ve glutamat salınımı da peri-infarkt depolarizasyonlara neden olmaktadır (Doyle ve ark., 2008). Bu nedenlerle

eksitotoksiteden ve hücre ölümünden esas olarak NMDA reseptörlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2006; Chen ve ark., 2008; Doyle ve ark., 2008; Hu ve ark., 2017).

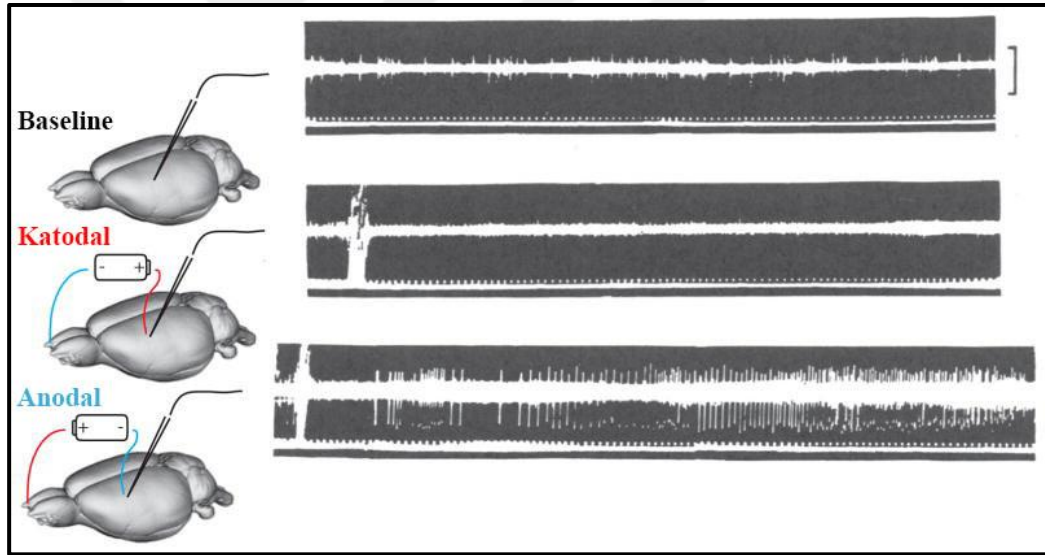
İskemi sırasında ekstrasellüler aralıkta artan glutamat NMDA ve AMPA reseptörleri aracılığıyla şiddetli ve devamlı depolarizasyon meydana getirmekte ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ile hücre içine bol miktarda Ca^{+2} girişi gerçekleşmektedir (Silver ve Erecinska, 1990). Normal koşullarda yüksek Ca^{+2} konsantrasyonu voltaj gradyenti veya ATP ile endoplazmik retikulum ve mitokondriye alınmakta ve depolanmaktadır (Silver ve Erecinska, 1990). İskemi sonrası nöronların içinde hızlı Ca^{+2} artışı olurken hücre dışında ise Ca^{+2} hızla azalmaktadır (Silver ve Erecinska, 1990). Hücre içerisine hızlı Ca^{+2} girişinin NMDA reseptörünün iyon kanalı ve voltaj-kapılı Ca^{+2} kanalları ile olduğu bilinmektedir (Siesjo, 1988; Choi, 1994a). Hücre içi Ca^{+2} artışında etkin olan bir diğer faktör ise endoplazmik retikulum ve mitokondri kaynaklı hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımının artışıdır (Zhang ve ark., 1993; Balkan, 2000). Hücre içindeki Ca^{+2} , Na^{+} - Ca^{+2} değiştirici sistem ve ATP kullanılarak Ca^{+2} pompası ile hücre dışına atılmakta ve böylelikle homeostazisin devamı sağlanmaktadır (Kristian ve Siesjo, 1998; Blomgren ve ark., 2003). İskemik koşullarda ise artan hücre içi Ca^{+2} normal koşullarda olduğu gibi endoplazmik retikulum ve mitokondriden hücre içine gönderilmekte, fakat enerji bağımlı Na^{+} - Ca^{+2} değiştirici sistemin bozulması sonucu artan Ca^{+2} hücre dışına gönderilememekte ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu aşırı miktarda artmaktadır (Kristian ve Siesjo, 1998; Blomgren ve ark., 2003; Orrenius ve ark., 2003). Hücre içi kalsiyum artışı Ca^{+2} bağımlı proteaz, lipaz, fosfolipaz, protein kinaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimleri uyararak hücre hasarına ve apoptozise yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır (De Gracia ve ark., 2002; Sugawara ve ark., 2004; Sanders ve ark., 2005).

2.4. Nöromodülasyon ve Doğru Akım Stimulasyonu

Nöromodülasyon, ses, manyetik veya elektrik akımı kullanılarak kısa ya da uzun süreli nöronal etkinliği değiştirmektir (Bashir ve Yoo, 2016). Nöromodülasyon tedavileri arasında kullanılan transkraniyal beyin uyarımı, beyindeki hastalıklı bölgelerin manyetik alan veya elektrik akımı yolu ile uyarılması temeline dayanan tedavi yöntemidir (Bashir ve Yoo, 2016).

Elektrik akımının tedavideki kullanımı yüz yıla yakın bir süredir mevcuttur (Stagg ve ark., 2018). Giovanni Aldini (Parent, 2004), ilk defa insanda serebral korteksi uyararak kontralateral fasiyal kaslarda kasılmayı gözlemlemiş ve bu alanda yeni bir çıkış açıp elektrik uyarısının tanı ve tedavide kullanımının ilerlemesine öncülük etmiştir. 20. yy.'a gelindiğinde teknolojinin gelişmesi ile birlikte elektriksel uyarım yöntemlerinde ve elektrot dizaynında birçok gelişme olmuştur. 1937 yılında Penfield ve Edwin (Penfield ve Boldrey, 1937) beyne elektriksel uyarı vererek motor homonkulusun sınırlarını çizmişlerdir. 1960'lı yıllarda düşük doğru akım uyarısının insan ve hayvan beynine etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır (Bindman ve ark., 1964; Froc ve ark., 2000). Bindman ve ark. (Bindman ve ark., 1964) ilk defa sıçanlar üzerinde elektrik stimülasyonu ile nöronal polarizasyon oluşturularak nöroplastisitenin indüklenebildiğini göstermişlerdir. Ayrıca nöronal polarizasyonun protein sentezi, hücre içi sıklık adenosin monofosfat ve Ca^{+2} seviyelerindeki değişimle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Hattori ve ark., 1990; Islam ve ark., 1995). Klinikte ilk defa transkraniyal elektrik uyarımı 1980 yılında Merton ve Morton tarafından yapılmıştır (Merton ve Morton, 1980). Klinikte Transkraniyel Manyetik Stimülasyon (TMS), Elektrokonvülsif Tedavi ve tDAS yaygın olarak kullanılmaktadır. 2000'li yıllara gelindiğinde bilim insanlarının nöromodülasyonun terapötik etkinliğine karşı ilgisi artmaya başlamıştır. İlk zamanlarda 0.02-0.5 mA gibi çok düşük elektrik akımları denenmiş fakat bu akımların etkinliklerinde çok fazla değişkenlik görülmesi nedeniyle daha sonraları akım değerleri 1-2 mA olan deneyler yapılmaya başlanmış ve terapötik etkileri araştıran çalışmalar artmaya devam etmiştir (Arul-Anandam ve Loo, 2009). Özellikle son yıllarda TMS ve tDAS uygulamaları travmatik spinal kord hasarı, fibromiyalji, santral ağrı ve migren gibi hastalıklarda ağrıyı azaltmada; psikiyatrik hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve inme rehabilitasyonu araştırmalarında; sağlıklı kişilerde ise öğrenme, bellek, karar verme gibi kognitif fonksiyonların etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılmaktadır (Stagg ve ark., 2018). TMS etkisini doğrudan nöronal depolarizasyon oluşturarak gösterirken, tDAS ise etkisini Na^{+} - Ca^{+2} bağımlı iyon kanallarının aktivasyonu üzerinden ve NMDA reseptör aktivitesi üzerinden uzun süreli potansiyalizasyon ve depresyon benzeri değişiklikler yaparak göstermektedir (Webster ve ark., 2006). Non-invaziv beyin uyarım tekniği olan tDAS ucuz ve kullanımı kolay olmakla birlikte nerede ise herhangi bir olumsuz yan etkiye sahip değildir (Nitsche ve ark., 2008). tDAS, serebral kortekse kafatasından yüzeysel olarak sabit ve düşük şiddette akım verilerek uygulanmakta ve kafatasına yerleştirilen aktif

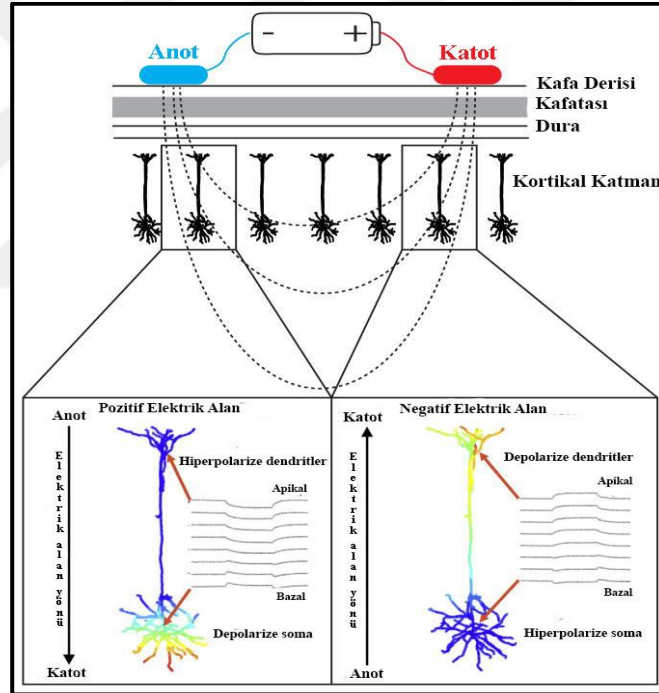
elektrottan verilen doğru akım beyin dokusunu geçerek referans elektroda ulaşmaktadır (Nitsche ve ark., 2008). tDAS ile yapılan çalışmalarda, tDAS tedavisi sonrasında bazı kişilerde uygulanan bölgede hafif kaşıntı, geçici baş ağrısı, halsizlik, bulantı görülmüş ve bunların dışında önemli bir yan etki gözlenmemiş, güvenilirlik çalışmalarında da nöronal hasar bildirilmemiştir (Stagg ve Nitsche, 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tDAS'ın nöronlarda aksiyon potansiyeli oluşturmada membran potansiyelini değiştirerek hücre uyarılabilirliğine ve epileptik deşarjlara yol açmadan etki ettiği gösterilmiştir (Miranda ve ark., 2006; Wagner ve ark., 2007). Beyinde oluşan değişikliğin derecesini uygulanan doğru akımın süresi, polaritesi ve akımın yönü belirlemektedir (Medeiros ve ark., 2012). Beyin dokusundan geçen akım kortikal bölgede artan veya azalan uyarılabilir etkiler oluşturmaktadır (Stagg ve Nitsche, 2011). Uyarılabilirliği akımın şiddeti ile anodal uyarım veya katodal uyarıma sahip olan polarite belirlemektedir (Stagg ve Nitsche, 2011).



Şekil 2.12. Anodal ve katodal tDAS uyarımı sonrası beyin aktivitesi

Transkraniyal doğru akım stimülasyonu anodal ve katodal tDAS olmak üzere iki türdür: Anodal uyarı eksitator etkiyle piramidal hücrelerin somasını depolarize ederken, katodal uyarı inhibitör etkiyle hiperpolarize yanıt oluşturmaktadır (Purpura ve Mc Murtry, 1965; Nitsche ve Paulus, 2000; Arul-Anandam ve ark., 2009). (Şekil 2.12.) tDAS uyarısının etkinliği uyarının süresine ve yerine bağlı olarak aktivasyonun veya inhibisyonun 90 dakikaya kadar sürdüğü ve yenileyen uyarımlardan sonra daha da uzun süre devam ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Alonzo ve ark., 2012; Galvez ve ark., 2013). Anodal tDAS uygulamasının nöronlarda Na^+ - Ca^{+2} bağımlı kanalların aktivasyonu ile nöron membranlarında depolarizasyon oluşturduğu ve kortikal

nöronların uyarılabilirliğini arttırdığı bilinmektedir (Stagg ve Nitsche, 2011). Anodal tDAS etkilerini hem GABAerjik (kısa intervalli intrakortikal inhibisyon), hem de glutaminerjik (intrakortikal fasilitasyon) sinapslardaki modülasyonla, katodal tDAS ise etkilerini sadece glutaminerjik sinaps modülasyonu ile göstermektedir (Stagg ve Nitsche, 2011; Medeiros ve ark., 2012). Literatürde tDAS'ın etkilerinin kısa dönemden ziyade uzun dönemde olduğu görülmüştür (Nitsche ve ark., 2008; Valle ve ark., 2009). tDAS uyarısının uzun dönemde NMDA reseptörlerini aktive ettiği ve oluşan etkinin uygulanan bölgedeki nöronal ağlara yayılabildiği rapor edilmiştir (Roizenblatt ve ark., 2007; Arul-Anandam ve ark., 2009; Stagg ve Nitsche, 2011). Nitsche ve Paulus (Nitsche ve Paulus, 2001) tDAS'ın presinaptik veya postsinaptik hücre uyarımından ziyade membran polarizasyonunda eşik altı uyarımlara sebep olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. Anodal ve katodal tDAS uyarımının nöronlar üzerindeki etkisi (Reinhart ve ark., 2017)

Son yıllarda invaziv olmayan ve nöroprotektif etkileri bilinen beyni uyarma tekniği olan tDAS klinikte tercih edilmekte, özellikle öğrenme ve hafıza bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Floel ve ark., 2012; Marquez-Ruiz ve ark., 2012). Serebral iskemi sonrası öğrenme ve hafıza bozukluğunu farklı yöntemlerle tedavi eden çalışmalar olmasına rağmen tDAS uyarımının öğrenme ve hafıza üzerine etkisini ve glutamat ile ilişkili moleküler mekanizmalarını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Projemizde iskemi reperfüzyon sonrası oluşan öğrenme ve hafıza

değişikliklerine tDAS uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Ayrıca tDAS'nin öğrenmede önemli rol oynayan hipokampal glutamat düzeyi, NMDA, AMPA reseptörleri, EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 ve VGLUT1 taşıyıcıları üzerinde etkisini araştıran ilk çalışmadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Grupları ve Protokolü

290-310 gr ağırlığındaki 100 adet erkek Wistar sıçan 5 gruba ayrılarak deneyler yapılmıştır.

Grup 1 (Sham): Sıçanlara iskemi ve tDAS uygulanmaksızın diğer tüm prosedürler uygulanmıştır.

Grup 2 (İR): Sıçanlara İR uygulanmış ve tDAS uygulanmaksızın tüm tDAS prosedürleri uygulanmıştır.

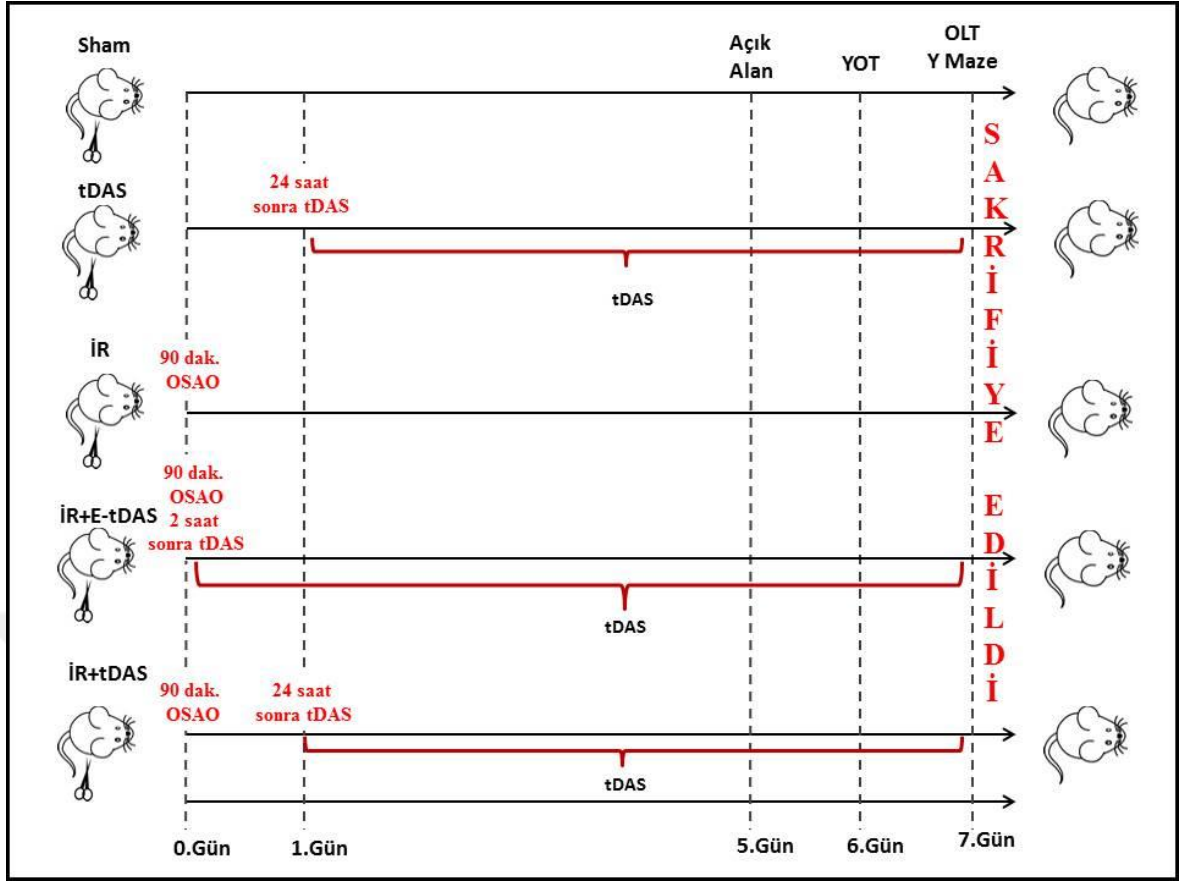
Grup 3 (tDAS): Sıçanlara İR yapılmaksızın cerrahi prosedürler uygulanmış, tDAS uygulaması yapılmıştır.

Grup 4 (İR+E-tDAS): Sıçanlara hem İR hem de cerrahiden 2 saat sonra başlamak kaydıyla (Erken) 8 gün boyunca tDAS uygulanmıştır.

Grup 5 (İR+tDAS): Sıçanlara İR uygulanmış ve İR'den 24 saat sonra başlamak kaydıyla 7 gün boyunca tDAS uygulanmıştır.

3.1.1 Deney Protokolü

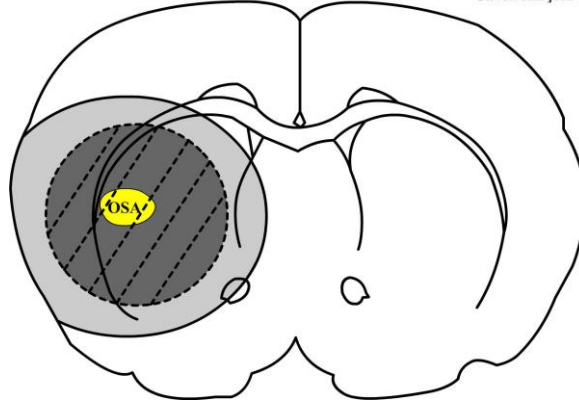
Deney boyunca hayvanlar her kafeste 1 hayvan olacak şekilde 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Deney süresince hayvanlar ticari sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmiştir. Deneyin 3. gününden başlayarak 2 gün boyunca günde 3 defa 5'er dakika ele alıştırma (handling) uygulanmıştır. Deneyin 5. gününde de sıçanlar açık alan testine, 6. gününde yeni obje tanıma testine (YOT), 7. gününde obje lokalizasyon testine (OLT) ve Y-maze deneylerine alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deney protokolü

3.1.2. İskemik Sıçan Modeli

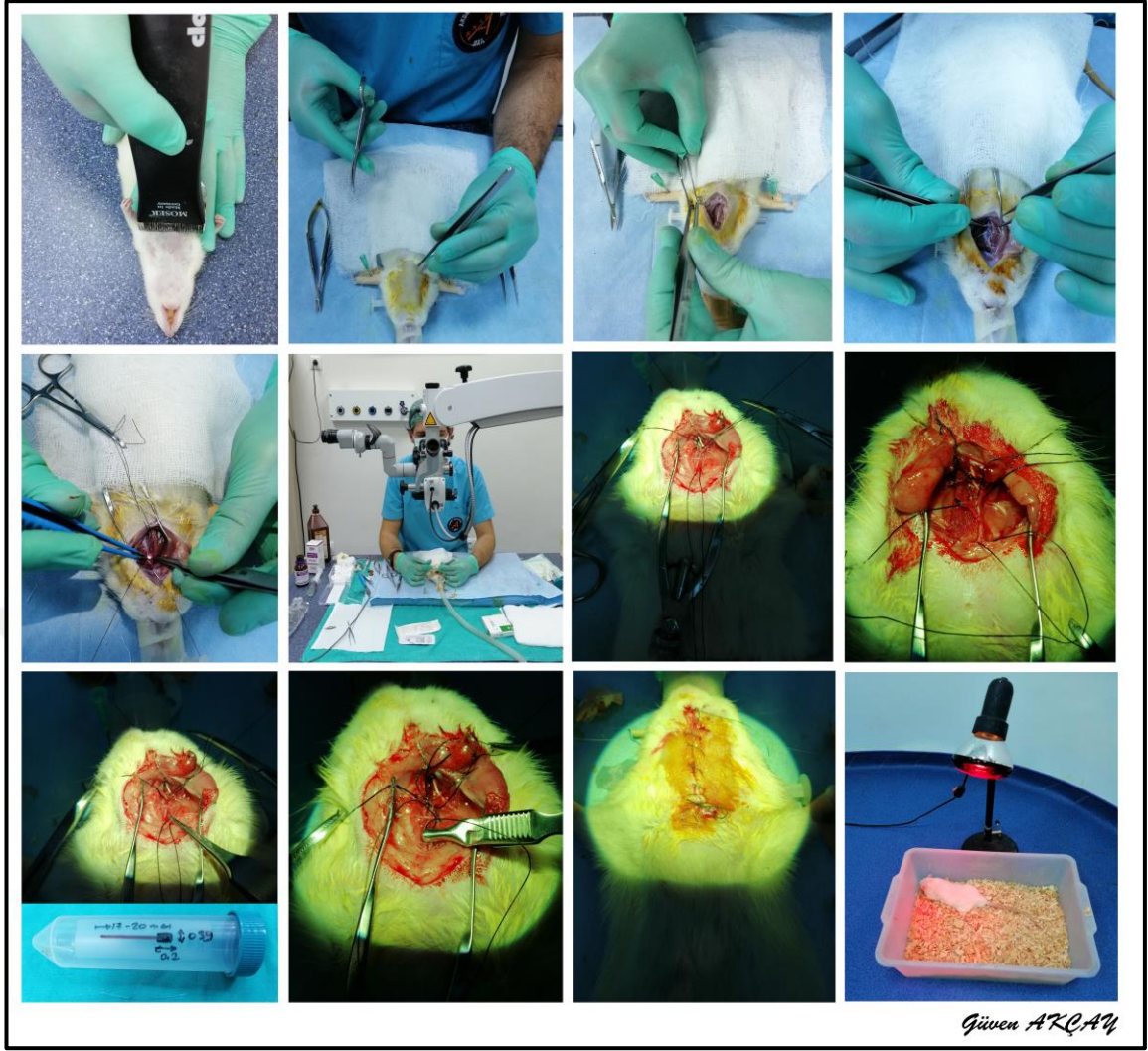
Geçici serebral iskemi hayvan modelleri (karotis ve/veya vertebral arter oklüzyonu ile) insanlarda oluşan iskemiye çok güzel taklit etmekte ve 3-7 günlük reperfüzyondan sonra hipokampusta önemli bir gecikmiş nöron ölümü meydana gelmektedir (Chen ve ark., 2005) (Şekil 3.2.). Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi modeli inmenin patofizyolojisini araştırmada en yaygın kullanılan modellerden biridir (Liu ve Mc Cullough, 2011; Shahjouei ve ark., 2016). Çalışmamızda serebral Longa ve ark. (Longa ve ark., 1989) tarafından geliştirilen orta serebral arter oklüzyonu (iskemi) ve reperfüzyonu modeli kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. OSA oklüzyonu ve ilk 4 saat hasar bölgeleri

Cerrahi işlemler %4'lük izofluran anestezisi altında iken gerçekleştirilmiş, sıçanların vücut sıcaklıkları ameliyat süresince $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ düzeyinde tutulmuştur. Boyundan sol common karotis arteri ortaya çıkaracak şekilde orta hat insizyonu yapılmış, internal ve eksternal karotis arterle açığa çıkarılarak ayrılmıştır. Sıçanların vücut ağırlığına bağlı olarak uzunluğu 18.5 ile 19.5 mm arasında değişen 4.0 monofilament naylon sütür ile internal karotis arter lümenine girilecek OSA bloke edilinceye kadar sütür ilerletilmiştir. 90 dakikalık iskemi sonrası sütür çıkartılarak reperfüzyon sağlanmış ve açılan kesi dikilerek cerrahi işlem sonlandırılmıştır (Şekil 3.4.). Sıçanların motor davranış indeksi ameliyattan 1 gün sonra değerlendirilmiştir (Lee ve ark., 2014).

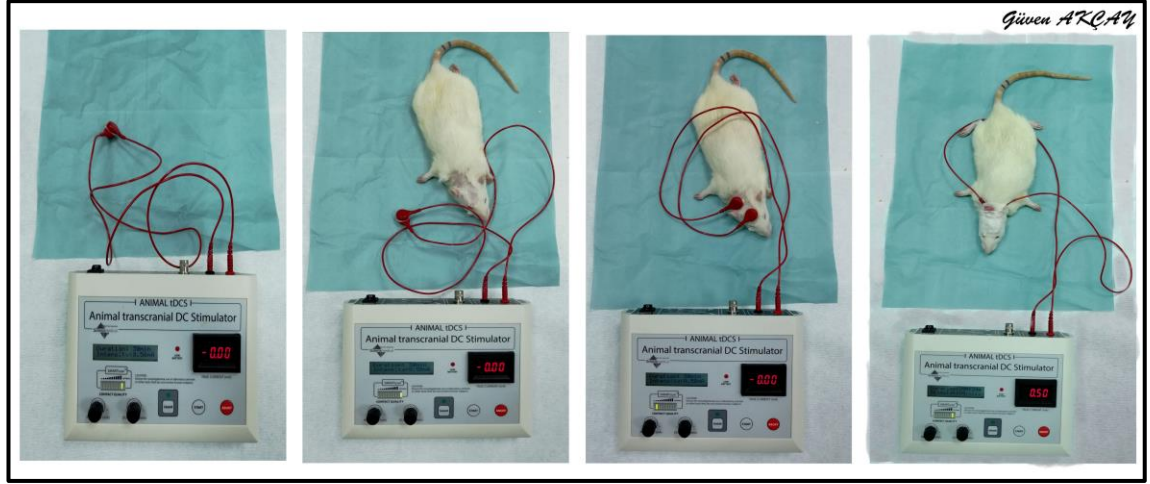
Motor davranış indeksi sıçanların iskemi olup olmadığı hakkında bilgi veren, motor performansı ve duyuşal fonksiyonu ölçen indekstir ve altı maddeden oluşmaktadır: 1) kendiliğinden aktivite, 2) dört eklem hareketinde simetri, 3) ön pençe uzatma, 4) tırmanma, 5) vücut propriosepsiyon ve 6) titreşimle temasa yanıt. Toplam puanlar 3 ile 18 arasında değerlendirilmiş ve 9-13 arasında puan alan sıçanlar deneye dahil edilmiştir.



Şekil 3.3. OSA iskemi/reperfüzyon cerrahi işlemleri

3.1.3. tDAS Uygulaması

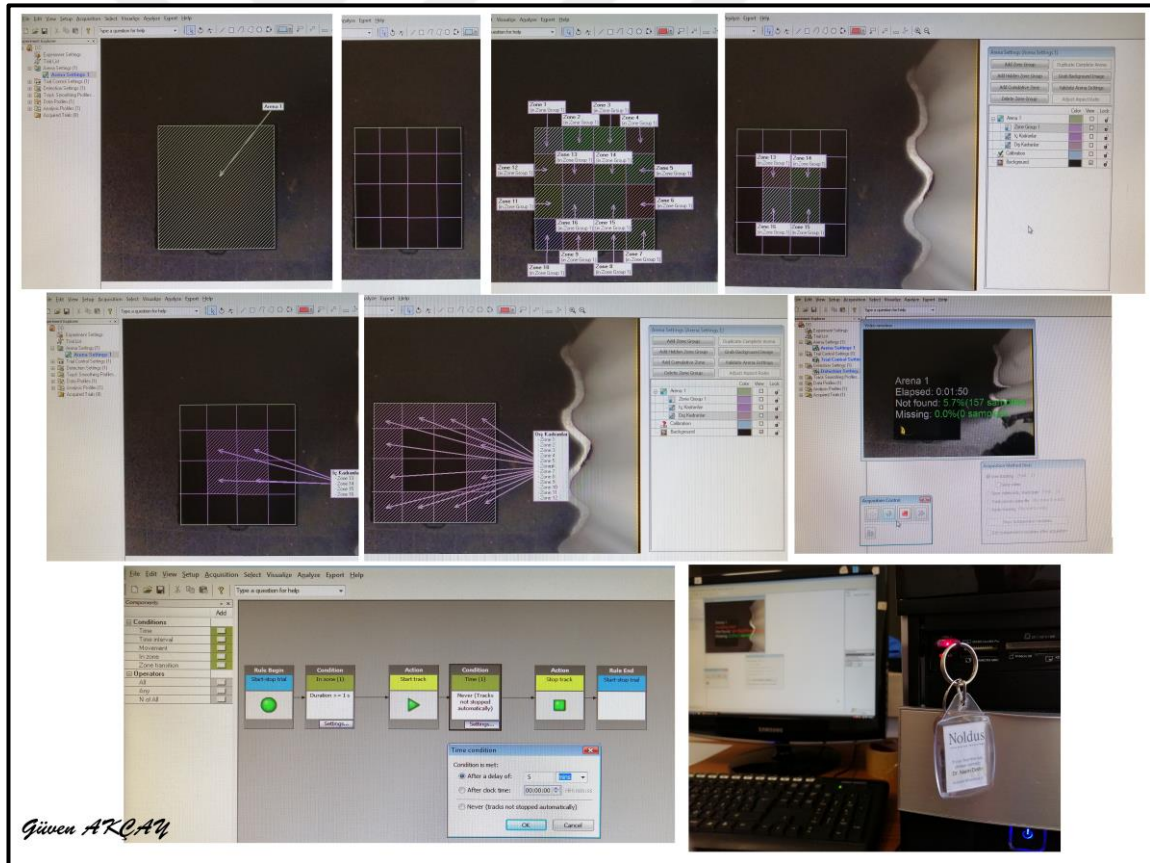
Çalışmamızda iskemi reperfüzyon sonrasında yüzeyel disk elektrot kullanılarak maksimum akım şiddeti $\pm 1000 \mu A$, akım çözünürlüğü $0.01 mA$ ve zamansal çözünürlüğü 1 dk olan Animal DCS Stimulator (model 2100) cihazı ile İR+E-tDAS grubuna 8 gün diğer gruptaki sıçanlara ise 7 gün boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde tDAS uygulaması yapılmıştır (Ferrucci ve ark., 2008; Notturmo ve ark., 2014) (Şekil 3.4.). Yapılan çalışmalarda 1.0-2.0 mA akım ve 10-30 dk aralığında değişen anodal ve katodal tDAS uygulamaları mevcuttur (Bennabi ve ark., 2014). Literatürdeki verileri kullanarak yapmış olduğumuz ön çalışmamızın sonucunda, izofluran anestezisi altında 0.5 mA, 30 dk anodal tDAS uygulamasına karar verilmiştir.



Şekil 3.4. tDAS uygulaması

3.2. Davranış Deneyleri

Yeni Obje Tanıma, Obje Lokalizasyon, Y-Maze ve Açık Alan Testleri Noldus Ethovision XT system (Şekil 3.5.) kullanılarak değerlendirilmiştir.

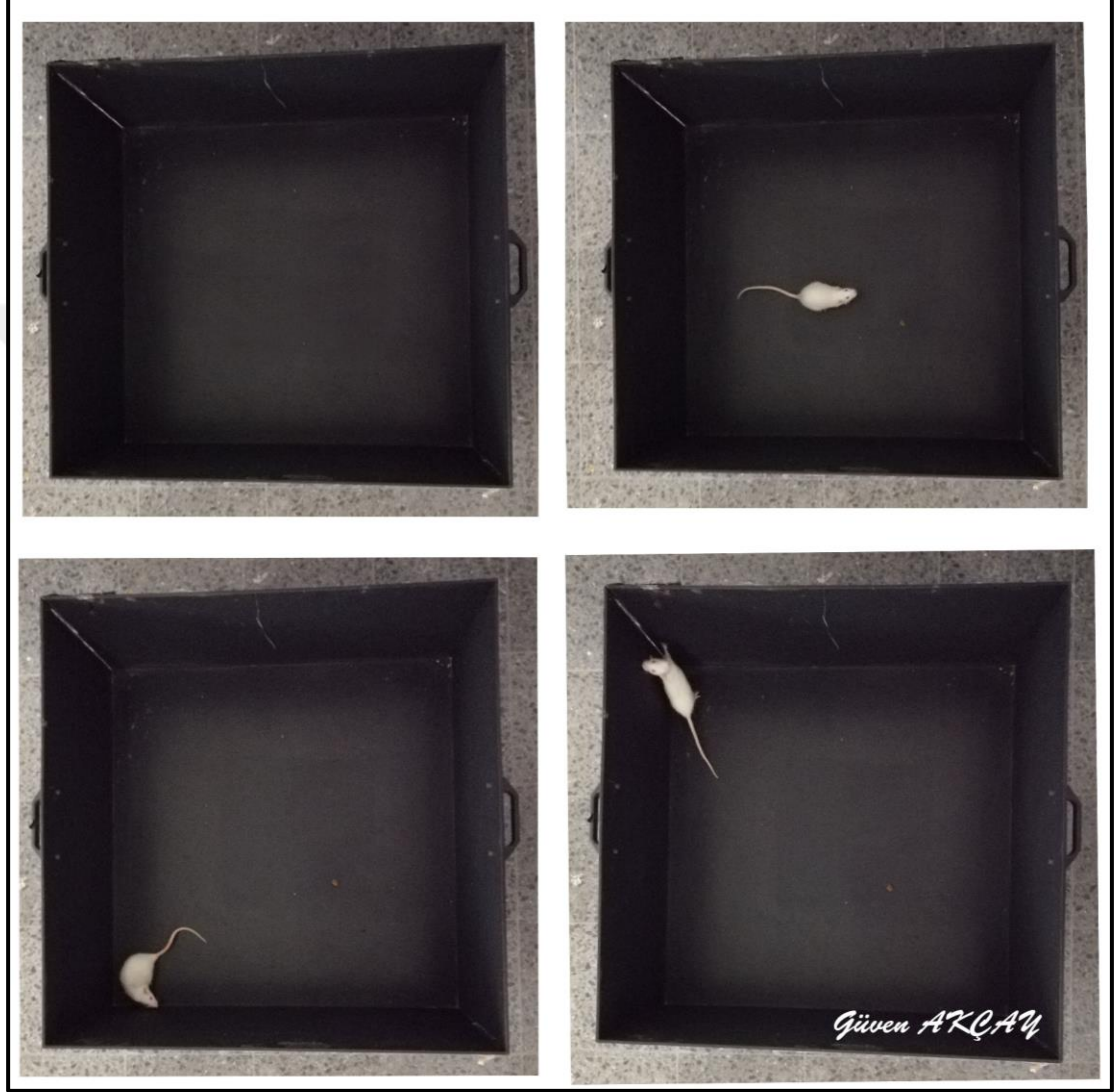


Şekil 3.5. Noldus Ethovision XT sistemi

3.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi, lokomotor aktiviteyi değerlendirmede kullanılan bir testtir. Açık alan deneyleri duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 80x80 cm ebatlarında kare şeklinde siyah

mat tabanlı düzenekte yapılmıştır (Şekil 3.6). Alan, 20 cm² büyüklüğünde birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüş, deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakılarak 5 dakika boyunca hareketleri kaydedilmiştir. Her sıçan için alınan toplam yol (cm), ortalama hız (cm/s) ve girilen kare sayısı ölçülmüştür (Denenberg, 1969; Berry ve ark., 2008).

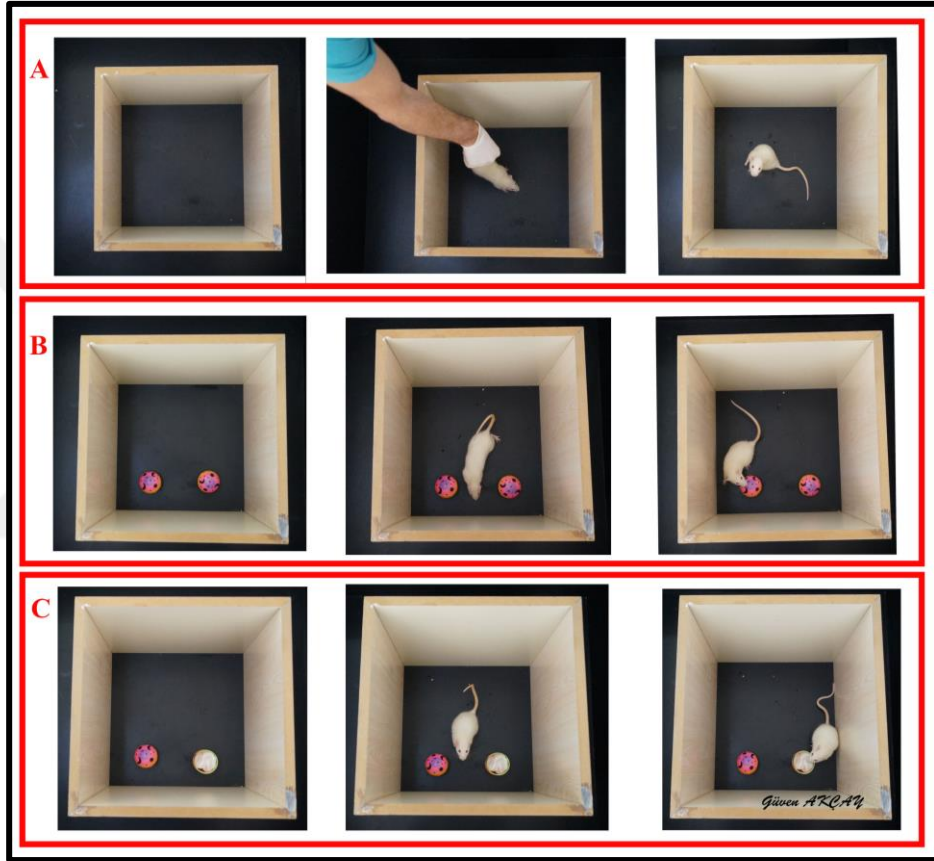


Şekil 3.6. Açık alan testi deney aşamaları

3.2.2. Yeni Obje Tanıma Testi

Yeni obje tanıma testi özellikle dikkat ve kısa süreli hafıza çalışmalarında kullanılmakta ve üç aşamadan oluşmaktadır: Alıştırma (habituation), eğitim (training) ve hatırlama (retention) (Şekil 3.7.). Alıştırma aşamasında sıçanlar 40 cm yüksekliğinde, 80x80 cm ebatlarındaki düzeneğin merkezine konularak ve ortamda herhangi bir obje yokken 5 dakika süreyle dolaşmasına izin verilmiştir. Eğitim aşamasında, sıçanlar merkezden alana bırakılmış ve ortama konan iki objeyi incelemesi

için 5 dakika süre tanınmıştır. Deneyler arasında sıçanların koku duyusuna göre hareketlerini engellemek için düzenek % 70'lik etanol ile temizlenmiştir. Hatırlama aşamasında ise objelerden biri yeni obje ile değiştirilmiş ve 5 dakika boyunca sıçanların davranışları kaydedilmiştir. Bu süreçte sıçanların yeni objeyi incelemek için daha fazla zaman harcaması beklenmektedir (Johnston ve ark., 2017). Yeni obje tanıma testinde ayrım indeksi ve yeni objede geçirilen süre (sn) değerleri analiz edilmiştir. Ayrım İndeksi = ((Yeni Objede Geçirilen Süre-Eski Objede Geçirilen Süre)/Toplam Süre)*100.

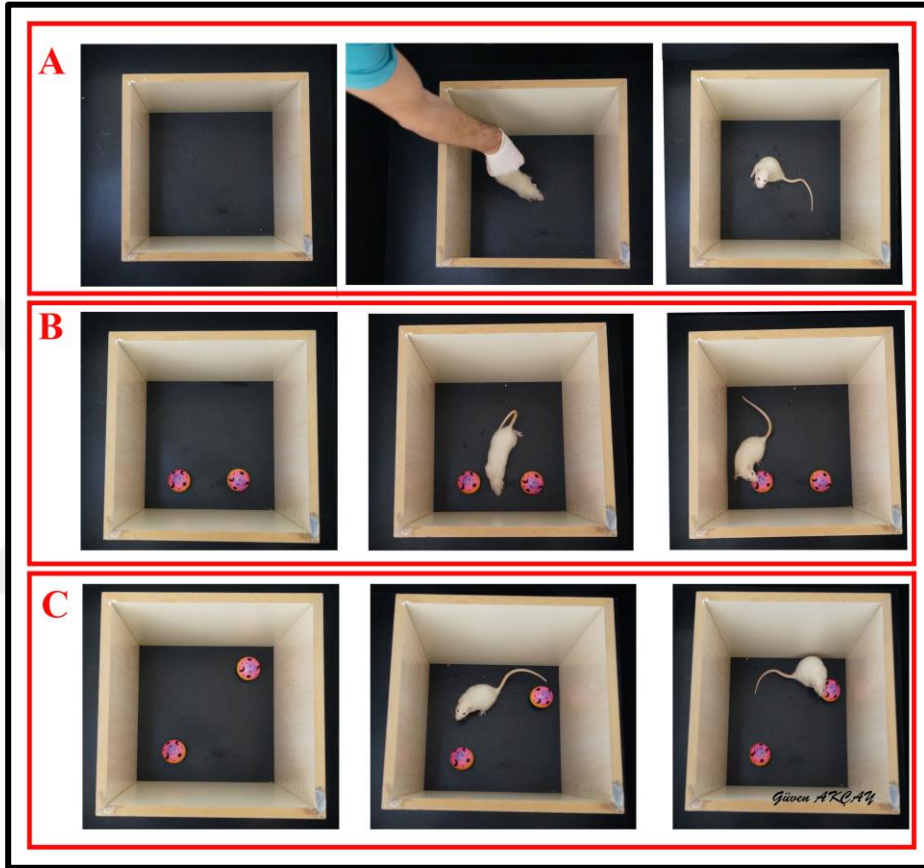


Şekil 3.7. Yeni obje tanıma testi deney aşamaları. A) Alıştırma aşaması, B) Eğitim aşaması, C) Hatırlatma aşaması.

3.2.3. Objelocalizasyon Testi

Objelocalizasyon testi özellikle kısa süreli ve uzaysal hafıza çalışmalarında kullanılmakta ve üç aşamadan oluşmaktadır: Alıştırma (habituation), eğitim (training) ve hatırlama (retention) (Şekil 3.8.). Alıştırma aşamasında sıçanlar 40 cm yüksekliğinde, 80x80 cm ebatlarında ki ortamın merkezine konulmuş ve ortamda herhangi bir obje yokken 5 dakika süreyle dolaşmasına izin verilmiştir. Eğitim aşamasında, sıçanlar merkezden alana bırakılmış ve ortama konan iki objeyi incelemesi için 5 dakika beklenilmiştir. Deneyler arasında sıçanların koku duyusuna göre

hareketlerini engellemek için labirent düzeneği %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Hatırlama aşamasında ise objelerden birinin yeri değiştirilmiş ve 5 dakika boyunca hayvanların davranışları kaydedilmiştir. Deneklerin yeri değiştirilen objeyi incelemek için daha fazla zaman harcaması beklenmektedir (Wagner ve ark., 2018). Objeye lokalizasyon testinde ayrım indeksi ve yeri değiştirilen objede geçirilen süre (sn) değerleri analiz edilmiştir. Ayrım İndeksi = ((Yeri Değiştirilen Objede Geçirilen Süre - Yeri Değişmeyen Objede Geçirilen Süre)/Toplam Süre)*100.

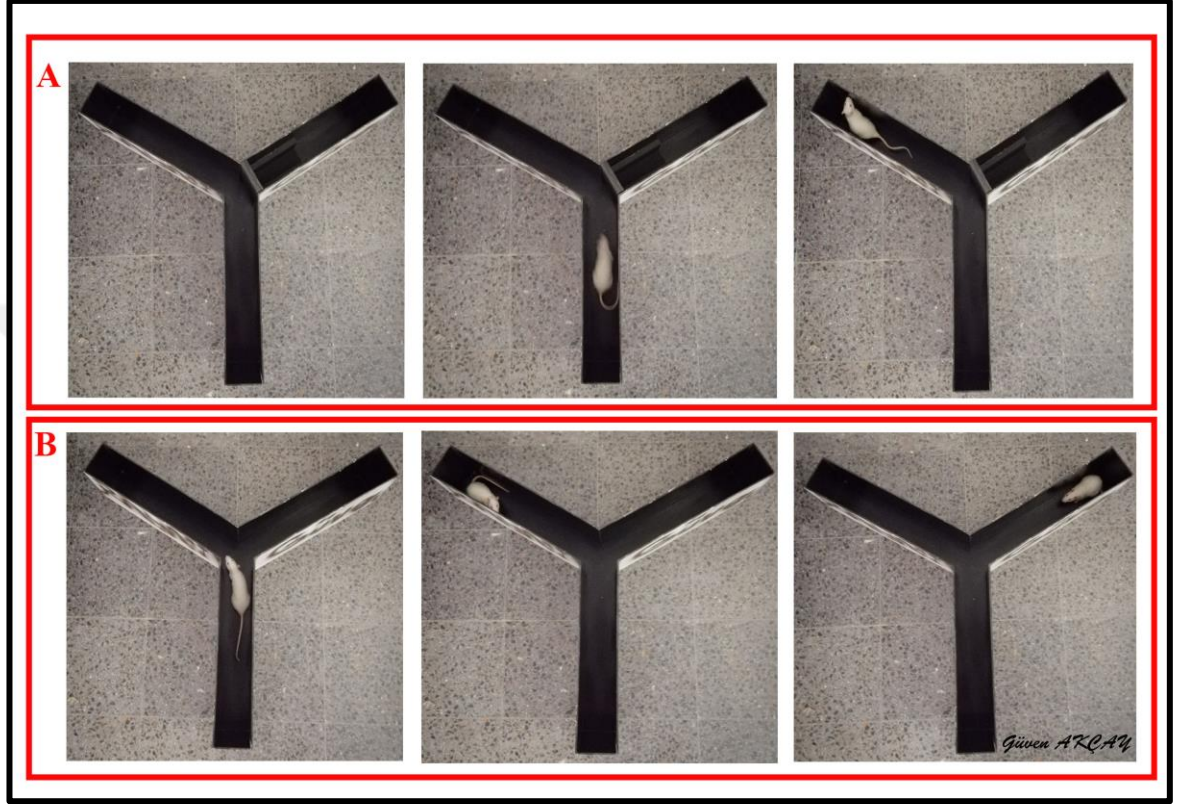


Şekil 3.8. Objeye lokalizasyon testi deney aşamaları. A) Alıştırma aşaması, B) Eğitim aşaması, C) Hatırlatma aşaması

3.2.4. Y-Maze Testi

Y-maze testi her bir kolu 50 cm uzunluğunda, 20 cm duvar yüksekliğinde ve 10 cm genişliğinde olan ve kollar arasındaki açının 120° olduğu üç koldan oluşan düzenekte yapılmıştır (Şekil 3.9.). Deney yapılacak odanın duvarları görsel ipuçları ile donatılmıştır. Çalışmamızda Y labirentin kolları 'başlangıç', 'diğer' ve 'yeni' kol olarak adlandırılmıştır. Deneyin ilk kısmında sıçanlar başlangıç kolunun ucuna bırakılmış, her bir sıçana yeni kol tamamen kapalı iken, diğer kolları serbestçe inceleyebilmeleri için 15 dakika zaman verilmiştir. 15 dakikanın sonunda sıçanlar kafeslere geri alınarak ve deney sırasında koku duyusuna göre hareketlerini engellemek

için Y-labirent düzeneği %70 etanol ile temizlenmiştir. Bir saat sonra yeni kol açılarak sıçanlar labirentin başlangıç koluna tekrar bırakılarak, 5 dakika boyunca her üç kolda serbestçe gezmelerine izin verilmiş ve bu sürede davranışları video ile kaydedilmiştir. Yeni kola giriş oranı ve yeni kolda geçirilen süre oranı analiz edilmiştir (Hansen ve ark., 2016).



şekil 3.9. Y maze testi deney aşamaları. A) Eğitim aşaması, B) Hatırlatma aşaması.

3.3. Doku Alımı ve Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

3.3.1 Doku Alımı

şekil 3.10.'da temsili olarak gösterildiği üzere öğrenme deneyleri tamamlanan sıçanlar üretan anestezisi altında transkardiyak perfüzyon ile beyin dokuları kandan arındırılarak çıkarılmış, hipokampusları ayrılarak sıvı nitrojende dondurulmuştur. Hipokampuslar biyokimyasal parametrelerin analizleri için -80°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.10. Beyin ve hipokampus diseksiyonu

3.3.2. Kütle Spektrometresi ile Glutamat ve Glutamin Tayini

Hipokampus dokularında glutamat ve glutamin amino asitlerinin düzeyi Casetta ve ark.'ın (Casetta ve ark., 2000) yöntemine göre saptanmıştır. Örnekler 100 ml dokuya içinde 2,5 mmol/l işaretli D-Glu bulunan 25 µl solüsyon eklenerek hazırlanmış, örnekler 800 µl metanol eklenerek 30 sn vortekslenmiş ve sonrasında 7200 g'de 10 dk. boyunca santrifüj edilerek süpernatantlar alınmıştır. 600 µl süpernatant kuruyana kadar uçurulduktan sonra 100 µl butanolik hidroklorit eklenerek ve 15 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kuruyana kadar nitrojen ile uçurularak ve üzerine içinde %50 asetonitril ve %0,025 formik asit içeren sulu çözeltiden 250 µl eklenerek örneklerin iyonlaşması sağlanmıştır. Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi yöntemi, LCMS (long chain mass spectroscopy) 8040 triple quadrupole MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. 5,5 kV kapiller voltaj seçilip 10 ml örnek cihaz enjektöründen

püskürtülerek damlacıkların iyonlaşması sağlanmış ve iyonlaşan damlacıklar Mass Lynx NT Software yazılımı ile sayılarak değerlendirilmiştir.

3.3.3. VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, NMDA1, NMDA2 ve AMPA

Reseptör Düzeylerinin RT-PCR Analizi

Hipokampus dokusunda total RNA izolasyonu, trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA (1-3 ug), cDNA sentezi için kullanılmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu, cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır. Kantitatif Real-time PCR deneyleri, SYBR Green PCR kit kullanılarak yapılmıştır. Oligonükleotid primerler sıçan VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, NMDA1, NMDA2 ve AMPA sekansları temel alınarak gen bankasından seçilmiş ve gen ekspresyon düzeyleri, internal standart geni kullanılarak normalize edilmiştir (F. Guo ve ark., 2010; Honma ve ark., 2012).

Real-time PCR

Total RNA izolasyonu:

Kontrol ve deney grubuna ait doku örneklerinden total RNA izolasyonu, trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MagNa Lyser Green Beads tüplerine alınan dokuların üzerine 1 mL trizol reaktifi eklenmiş ve homojenizasyon işlemi MagNa Lyser cihazında 3000 rpm 30 sn'de yapılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra Invitrogen'in protokolüne göre RNA izolasyonu tamamlanmıştır. Protokol sonunda elde edilen RNA pelletleri üzerine RNaz-içermeyen su konulmuş, toplanan RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Daha sonra tüpler -80°C'ye kaldırılmıştır.

DNaz-muamelesi:

RNA (3 µg) 1U DNaz I (Invitrogen) ile muamele edilmiş ve komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanılmıştır.

cDNA sentezi:

cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNaz ile muamele edilmiş olan 3 µg RNA örneğine, 10xRT tamponu, 25xdNTPmix, 10xRT random primerler, RNase inhibitör ve Multiscribe reverse transcriptase (50 U/µL)'den oluşan toplam 10 µL'lik cDNA sentez karışımı ilave edilip yavaşça karıştırılmıştır. Bu karışım, 25°C'de 10 dk., 37°C'de 120

dk. inkübe edilmiştir. Reaksiyon 85°C’de 5 dakika inkübe edilerek sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA’lar PCR için kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

Real-time PCR reaksiyonu:

Sıçan EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1, NMDAR1, NMDAR2, AMPAR ve GAPDH için spesifik primerler (Tablo 3.1.) QuantStudio 3 Real-Time PCR(Applied Biosystems) cihazında, Power SYBR® Green Master Mix protokolüne göre Real-time PCR çalışılmıştır. Reaksiyon karışımı; 10 µL Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X), 10 µM forward ve 10 µM reverse primer, 2 µL cDNA ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde nükleaz-içermeyen sudan oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları; 95 °C’de 10 dakika, 95 °C’de 15 sn, 60 °C’de 30 sn ve 72 °C’de 30 sn olacak şekilde oluşturulmuştur. QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazına ait software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri belirlenmiştir. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplanmıştır. Amplifikasyon, 40 siklusta gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. Real-time PCR için kullanılan primerlerin sekansları

Hedef Gen	Sekans	Fragment Büyüklüğü
EAAT1	İleri 5'-ACCTCCTCAAGTTCTGCCAC-3' Geri 5'-TCTGGTGATGCGTTTGTCCAC-3'	82
EAAT2	İleri 5'-GTGGACTGGCTGCTGGATAG-3' Geri 5'-GCTCGGACTTGGAAGGTGA-3'	94
EAAT3	İleri 5'- CCGATTCTCACAACGCC-3' Geri 5'- ACTCCTACCACGATGCCAG-3'	137
VGLUT1	İleri 5'- TGGTGGAGGGGGTCACATAC-3' Geri 5'- AGGAACCGCAAAAGGCTGTC -3'	102
NMDAR1	İleri 5'- CACACAGGAGCGGGTAAACA-3' Geri 5'- TGTGATGGTCAGTGGTGCC-3'	107
NMDAR2A	İleri 5'-CCAGTTTGTGGTGATGGTGAG-3' Geri 5'- ACCTCATTCTTCTCGTTGTGGC-3'	81
AMPAR1	İleri 5'- CATGATGGAATCCGAAAGATTGGT-3' Geri 5'- CTTGAGTTGTCCCCTCCAGC-3'	92
GAPDH	İleri 5'- GTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3' Geri 5'-AGAGAAGGCAGCCCTGGTAA-3'	91

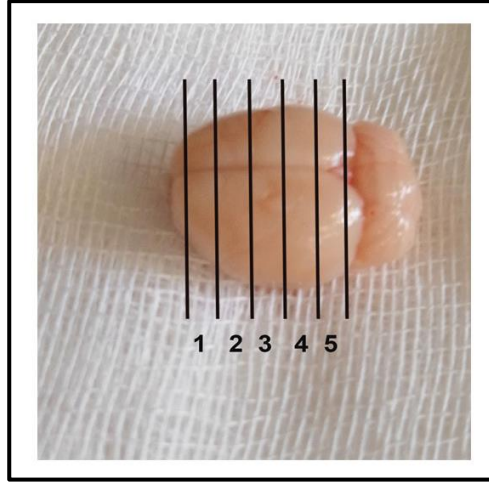
3.3.4. Trifeniltetrazolyum Klorür ile İskemik Hasarın Tespiti

Trifeniltetrazolyum klorür (TTC) metabolik olarak aktif ve inaktif dokuları ayırmak için kullanılmaktadır. İskemik alanları belirlemek için her gruptan üç hayvanın beyin dokusu çıkarılarak hızlı bir şekilde 2mm kesitlere bölünmüş 30 dk. boyunca 37°C de %2'lik TTC boyamasına alınarak iskemik hasar tespiti yapılmıştır. Normal kısımlar kırmızı boyanırken iskemik alanların soluk pembe veya beyaz renkte boyandığı gözlenmiştir. İnfarkt alan ve hacim hesabı İmage J ile analiz edilip, Lin ve ark.'ın (Lin ve ark., 1993) kullandığı formül kullanılarak hesaplanmıştır.

İnfarkt Hacim=(Sağ hemisfer alan-(Sol hemisfer alan-Sol hemisfer infarkt alan))xd,

d kesit kalınlığını ifade etmektedir. TTC boyaması için beyin 2 mm kesit kalınlığı olacak şekilde 5 parçaya bölünmüştür.

- 1) %2 TTC(g/mL)(MERCK 108380) serum fizyolojik içerisinde hazırlanmıştır. TTC çözeltisi her kullanım için yeniden hazırlanıp kullanılmıştır. Çözeltinin ışığa maruziyetini engellemek için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Çözelti oda ısısında (37 °C) muhafaza edilmiştir. Her beyin için yaklaşık 0.4 gr:20 mL TTC:SF çözeltisi yeterlidir.
- 2) Diseke edilen beyin dokularının 30 dakika -20°C buzlukta bekletilerek sertleşmesi sağlanmıştır.
- 3) Total beyin frontal bölgeden başlanarak serebelluma doğru kesilerek 5 parçaya ayrılmıştır (Şekil 3.11.).
- 4) Beyin kesitleri 20 mL %2 TTC çözeltisi içeren petri kabına konulmuştur.
- 5) Petri kabı alüminyum folyuyla tekrar sarılarak 30 dakika 37 °C'de etüvde ara ara sallanarak inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) 30 dakika sonra petri kabına bakan beyin yüzeyleri üstte kalacak şekilde siyah bir zemine konularak fotoğrafları çekilmiştir.
- 7) Normal beyin dokusu kırmızı renkte, iskemik hasarlı alanlar ise soluk pembe veya beyaz renkte görülmektedir.



Şekil 3.11. TTC boyamanın beyin kesitleri.

3.4. İstatistiksel Analiz

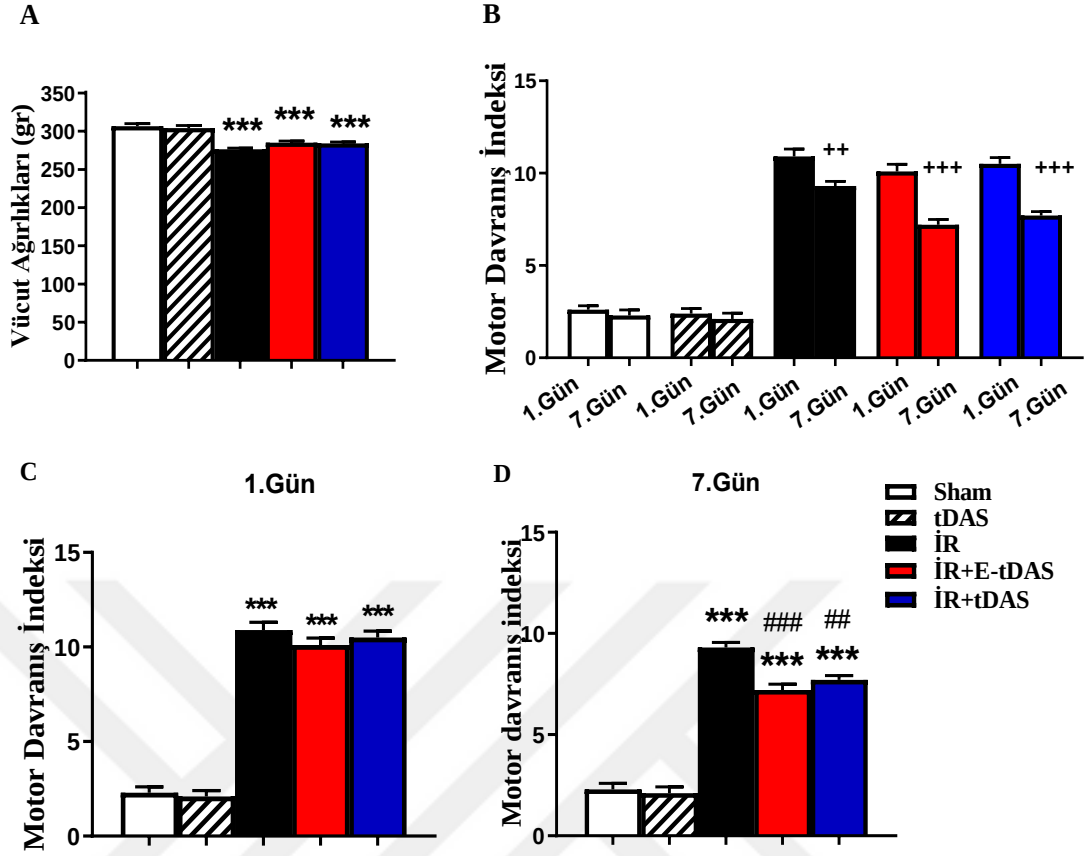
Verilerin analizi SPSS 20.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Shapiro Wilk testiyle yapılan değerlendirmede normal dağılıma uyan verilerin analizinde, Paired T ve One-way ANOVA testi kullanılmış, gruplar arası ikili karşılaştırılmada ise post-hoc Tukey testiyle analiz edilmiştir. Normal dağılıma uymayan verilerin analizi Kruskal Wallis testi ile yapılmış, grupların ikili karşılaştırmasında Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlar Ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıkları ve Motor Davranış İndeksi Bulguları

Deney gruplarının vücut ağırlıkları deney protokolünün 7.gününde değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.1.A. ve Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Sham grubuna göre İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının vücut ağırlıklarında anlamlı azalma tespit edilmiştir. İskemi yapılan deney gruplarının vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Benzer şekilde Sham ve tDAS grupları arasında da vücut ağırlığı açısından fark görülmemiştir.

Motor davranış indeksi iskemi reperfüzyonun hem 1. gününde hem de 7. gününde ölçülmüş, veriler Tablo 4.1.'de belirtilmiştir. İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının motor davranış indeksleri 1.güne kıyasla 7.günde anlamlı düzeyde düştüğü, özellikle bu düşüşün İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.B.). Sham grubuna kıyasla İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının 1.gün motor davranış indeksleri arasında anlamlı seviyede artış tespit edilmiştir (Şekil 4.1.C.). İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS grupları arasında herhangi bir farka rastlanmamıştır. 7.gün motor davranış indekslerinde incelendiğinde ise İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında Sham grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. Şekil 4.1.D.'de görüldüğü üzere İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarındaki sıçanların 7. gün motor davranış indekslerinin İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Vücut ağırlıkları ve motor davranış indeksi bulguları. A) Sıçanların vücut ağırlıkları, B) Grupların 1. ve 7. gün motor davranış indekslerinin kıyaslanması, C) Grupların 1. gün motor davranış indeksleri. D) Grupların 7. gün motor davranış indeksleri. *** $p<0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # $p<0.05$, ## $p<0.01$, İR grubuna göre farkı göstermektedir. ++ $p<0.001$, +++ $p<0.0001$, grupların 1.günü motor davranış indeksine göre farkı göstermektedir.

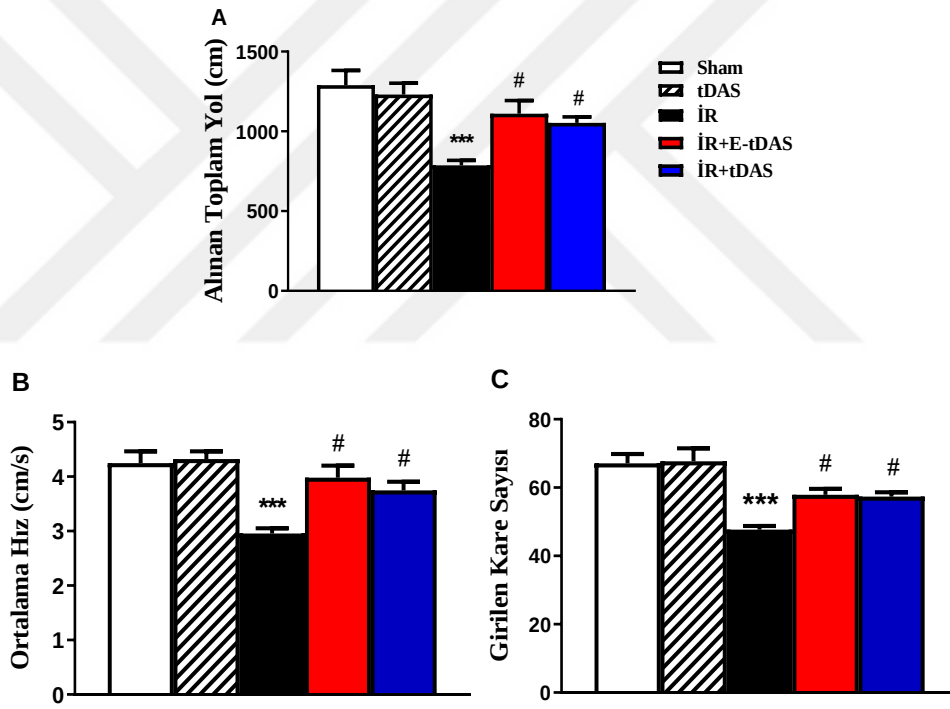
Tablo 4.1. Vücut ağırlıkları ve motor davranış indeksi bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Vücut Ağırlığı (gr)	306.50±3.25	304.00±3.56	276.30±1.64***	285.00±2.24***	283.90±1.91***
Motor Davranış İndeksi (1.Gün)	2.60±0.22	2.40±0.27	10.90±0.41***	10.10±0.79***	10.50±0.34***
Motor Davranış İndeksi (7.Gün)	2.30±0.30	2.10±0.32	9.30±0.28***,++	7.20±0.29***,###,++	7.70±0.22***,##,++

*** $p<0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # $p<0.05$, ## $p<0.01$, İR grubuna göre farkı göstermektedir. ++ $p<0.001$, +++ $p<0.0001$, grupların 1.günü motor davranış indeksine göre farkı göstermektedir.

4.2. Açık Alan Testi Bulguları

Deney gruplarının açık alan testinde, alınan toplam yol (cm), ortalama hız (cm/s) ve girilen kare sayısı değerleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Açık alan testinde grupların alınan toplam yol (cm), ortalama hız (cm/s) ve girilen kare sayısı parametrelerinin Sham grubuna göre İR grubunda anlamlı azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.). İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının alınan toplam yol, ortalama hız ve girilen kare sayısında İR grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. İR+tDAS ve İR+E-tDAS grupları lokomotor aktivite değerleri Sham ve tDAS gruplarının değerlerine yaklaştığı görülmektedir. Sham ve tDAS grupları lokomotor aktivite parametreleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Benzer şekilde İR+tDAS ve İR+E-tDAS grupları arasında da farka rastlanmamıştır.



Şekil 4.2. Açık alan testi bulguları. A) Alınan toplam yol (cm), B) Ortalama hız (cm/s), C) Girilen kare sayısı. *** $p<0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # $p<0.05$, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

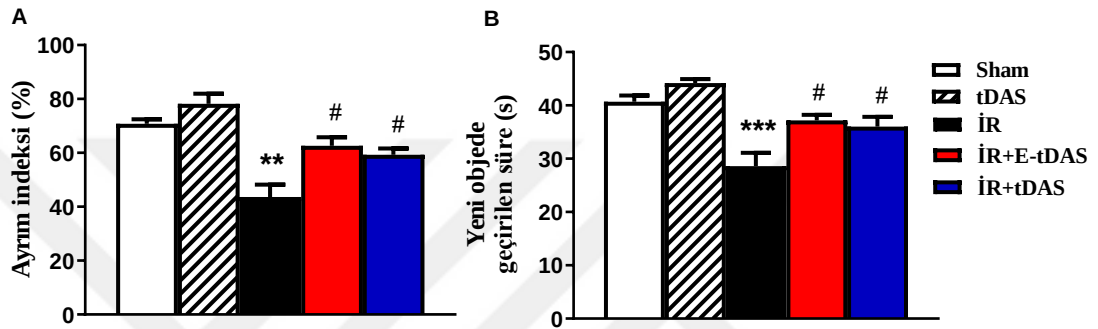
Tablo 4.2. Açık alan testi bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Alınan Toplam Yol (cm)	1289.79±91.97	1230.40±71.60	786.84±30.83***	1111.07±82.06 [#]	1052.53±38.37 [#]
Ortalama Hız (cm/s)	4.25±0.22	4.32±0.14	2.96±0.10***	3.98±0.22 [#]	3.75±0.16 [#]
Girilen Kare Sayısı	67.10±2.74	67.70±3.81	47.72±1.05***	57.87±1.75 [#]	57.38±1.28 [#]

*** $p<0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # $p<0.05$, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.3. Yeni Obje Tanıma Testi Bulguları

Tüm grupların yeni obje tanıma testi ayırım indeksi (%) ve yeni objede geçirilen süre (s) parametreleri Tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Ayırım indeksi ve yeni objede geçirilen süre parametreleri değerlendirildiğinde sham grubuna kıyasla İR grubunda anlamlı seviyede azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3.A.). tDAS, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında hem ayırım indeksi hem de yeni objede geçirilen süre değerlerinin, İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.3.B.). Sham ve tDAS grupları arasında ise istatistiksel olarak fark tespit edilmemiştir.



Şekil 4.3. Yeni obje tanıma testi bulguları. A) Ayırım indeksi (%), B) Yeni objede geçirilen süre (s). ** p<0.01, *** p<0.001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

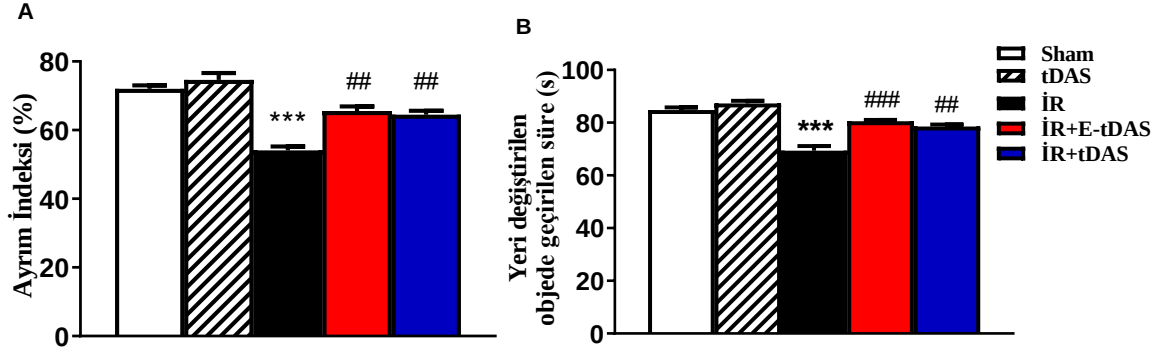
Tablo 4.3. Yeni obje tanıma testi bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Ayırım indeksi (%)	70.78±1.69	78.17±3.78	43.64±4.60**	62.59±3.19#	59.31±2.32#
Yeni objede geçirilen süre (s)	40.67±1.18	44.17±0.76	28.61±2.51***	37.19±1.04#	36.00±1.84#

** p<0.01, *** p<0.001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.4. Obje Lokalizasyon Testi Bulguları

Obje lokalizasyon testi ayırım indeksi (%) ve yeri değiştirilen objede geçirilen süre (s) değerleri Tablo 4.4.'te verilmiştir. Obje lokalizasyon testi sonuçlarına baktığımızda sham ve tDAS grupları arasında fark bulunmazken, Sham grubuna kıyasla ayırım indeksi (Şekil 4.4.A.) ve yeri değiştirilen objede geçirilen süre (Şekil 4.4.B.) değerlerinin İR grubunda anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. İR grubuna kıyasla İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının obje lokalizasyon testi parametrelerinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı saptanmıştır.



Şekil 4.4. Obje lokalizasyon testi bulguları. A) Ayrım indeksi (%), B) Yeri değiştirilen objede geçirilen süre (s). *** $p < 0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

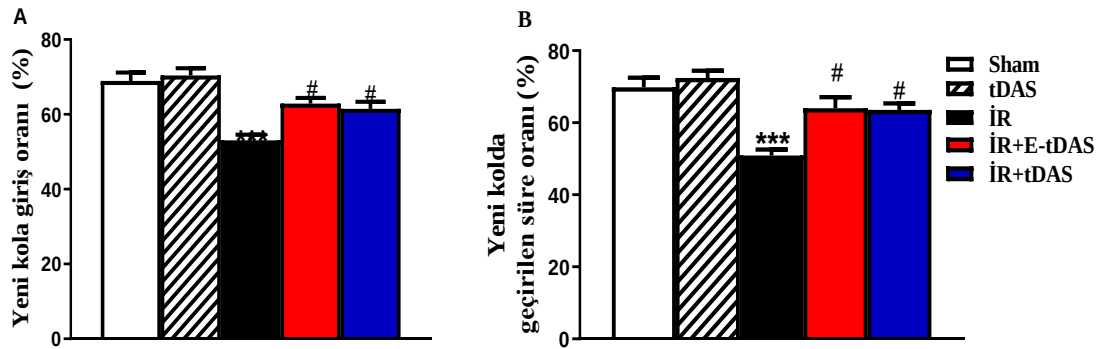
Tablo 4.4. Obje lokalizasyon testi bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Ayrım indeksi (%)	66.50±2.35	69.18±1.29	49.23±1.58***	57.20±1.18##	59.00±0.95##
Yeri değiştirilen objede geçirilen süre (s)	42.40±0.49	45.36±1.02	35.85±0.63***	41.36±1.46###	39.45±0.78##

*** $p < 0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.5. Y-Maze Testi Bulguları

Y-maze testi analiz parametreleri olan yeni kola giriş (%) ve yeni kolda geçirilen süre oranı (%) değerleri Tablo 4.5.'de gösterilmektedir. Y-maze testi parametreleri açısından sham ve tDAS gruplarının sonuçları benzer olup, İR grubunun yeni kola giriş oranı (Şekil 4.5.A.) ve yeni kolda geçirilen süre oranı (Şekil 4.5.B.) değerlerinde Sham grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir. İR grubuna göre İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının Y-maze test değerlerinde anlamlı derecede artış saptanmıştır. İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının Y-maze testi değerlerinin Sham ve tDAS gruplarının değerlerine yaklaştığı görülmüştür.



Şekil 4.5. Y maze testi bulguları. A) Yeni kola giriş oranı (%), B) Yeni kolda geçirilen süre oranı (%). *** $p < 0.001$, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # $p < 0.05$, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

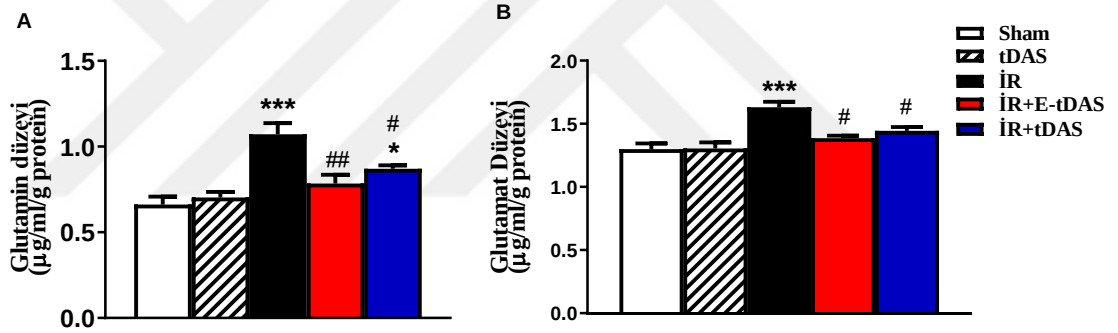
Tablo 4.5. Y maze testi bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Yeni kola giriş oranı (%)	68.92±2.27	70.41±1.95	52.04±1.74***	65.00±1.95 [#]	61.65±2.43 [#]
Yeni kolda geçirilen süre oranı (%)	69.47±3.78	73.95±4.56	42.09±2.34***	66.06±6.94 [#]	60.62±5.91 [#]

*** p<0.0001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.6. Glutamat ve Glutamin Düzeyi Bulguları

Tablo 4.7.'de hipokampus dokusunda glutamat ve glutamin düzeyleri gösterilmiştir. Hipokampus glutamat ve glutamin düzeyleri değerlendirildiğinde Sham ve tDAS grupları arasında fark bulunmazken, İR grubunun glutamin (Şekil 4.6.A.) ve glutamat (Şekil 4.6.B.) düzeylerinin Sham grubuna göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Ayrıca Sham grubuna kıyasla İR+tDAS grubunun sadece glutamin konsantrasyonunda anlamlı artış tespit edilmiştir. İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının glutamin ve glutamat değerlerinin İR grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.6. Deney gruplarının hipokampus dokusunda, A) Glutamin düzeyleri, B) Glutamat düzeyleri. * p<0.05, *** p<0.0001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, ## p<0.01, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

Tablo 4.6. Hipokampus dokusunda glutamin ve glutamat düzeyi bulguları

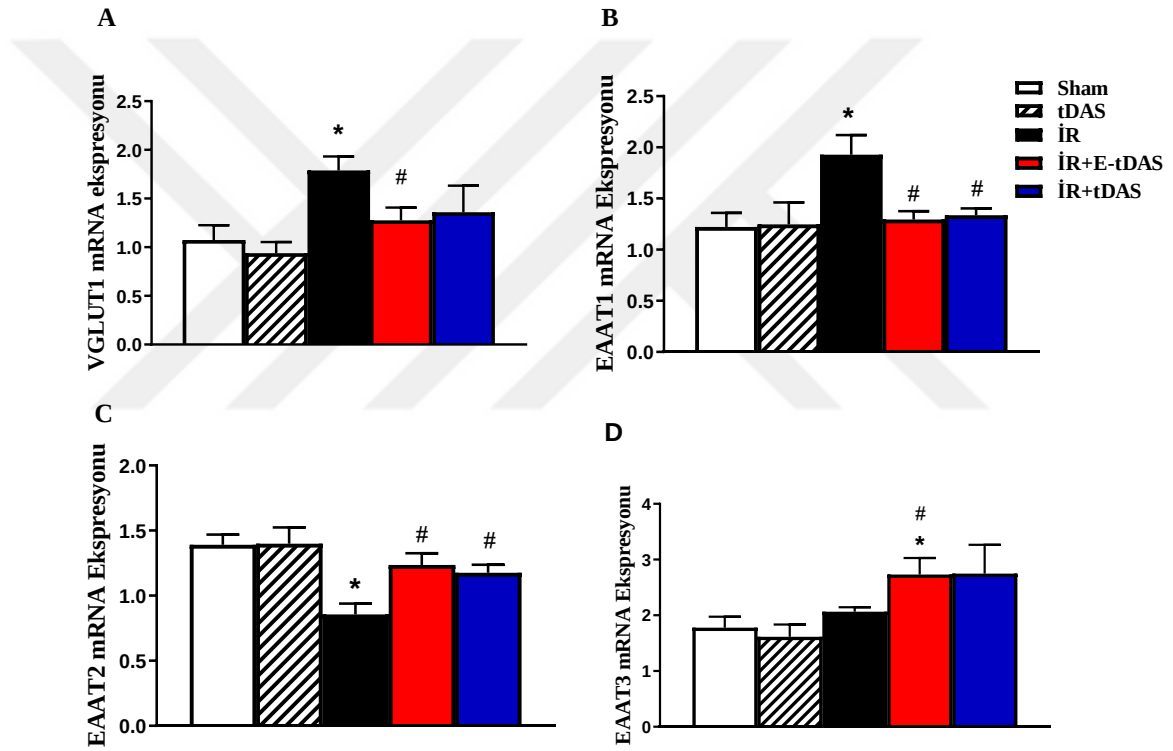
Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
Glutamin Düzeyleri (µg/ml/g protein)	0.66±0.05	0.70±0.03	1.07±0.07***	0.78±0.05 ^{##}	0.87±0.02 ^{*,#}
Glutamat Düzeyleri (µg/ml/g protein)	1.30±0.05	1.31±0.05	1.63±0.04***	1.39±0.02 [#]	1.45±0.03, [#]

* p<0.05, *** p<0.0001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, ## p<0.01, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.7. VGLUT-1, EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3 mRNA Ekspresyon Bulguları

VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 mRNA ekspresyonları Tablo 4.8.'de gösterilmiştir. Sham grubuna göre İR grubunun VGLUT1 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.7.A.). VGLUT1 ekspresyonunda İR grubuna kıyasla İR+E-tDAS grubunda anlamlı azalma görülürken, İR+tDAS grubundaki azalmanın

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.A.). EAAT1 de ise sham grubuna göre İR grubunda anlamlı artış olduğu, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında İR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı sham grubuna yakın değerlere ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.7.B.). EAAT2 ekspresyonunda ise sham ile kıyaslandığında İR grubunda anlamlı azalma olduğu, İR'ye göre İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7.C.). Sham grubuna göre EAAT3 mRNA ekspresyonu İR, İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında arttığı ve özellikle İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında daha fazla olduğu görülmüş, fakat bu artışlardan İR+E-tDAS grubunda anlamlılık bulunurken İR+tDAS grubunda ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.7.D.).



Şekil 4.7. Hipokampus dokusunda A) VGLUT1 mRNA ekspresyonları, B) EAAT1 mRNA ekspresyonları, C) EAAT2 mRNA ekspresyonları D) EAAT3 mRNA ekspresyonları. * p<0.05, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

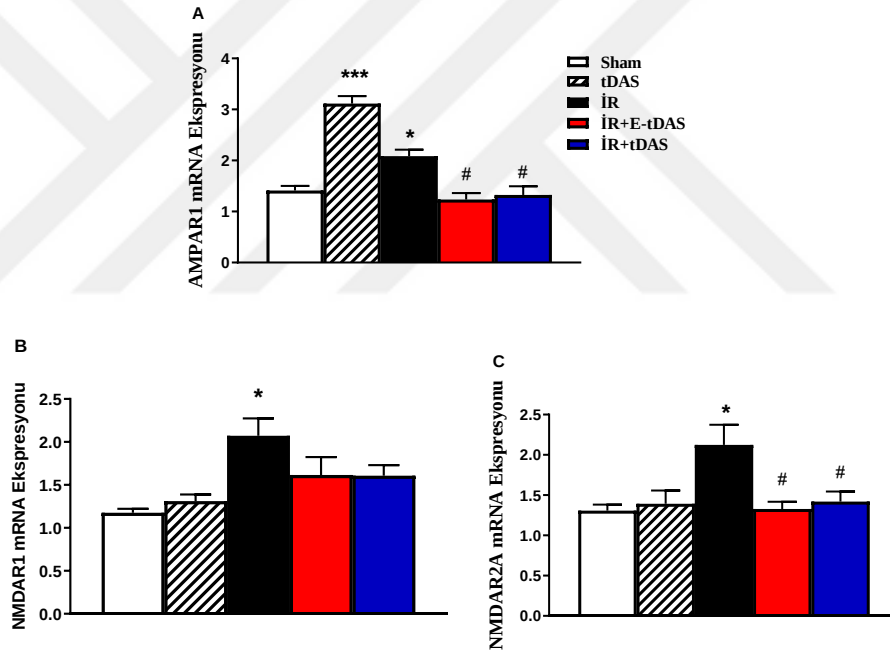
Tablo 4.7. Hipokampus dokusunda VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 mRNA ekspresyon bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
VGLUT1 mRNA Ekspresyonu	1.08±0.15	0.90±0.12	1.78±0.14*	1.28±0.13#	1.36±0.27
EAAT1 mRNA Ekspresyonu	1.22±0.14	1.25±0.21	1.93±0.19*	1.30±0.08#	1.34±0.07#
EAAT2 mRNA Ekspresyonu	1.22±0.08	1.40±0.13	0.88±0.10*	1.24±0.19	1.18±0.06
EAAT3 mRNA Ekspresyonu	1.78±0.20	1.62±0.22	2.06±0.08	2.73±0.30	2.75±0.52

* p<0.05, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.8. AMPA1, NMDA1 ve NMDA2A Reseptör mRNA Ekspresyon Bulguları

AMPA1, NMDAR1 ve NMDAR2A mRNA ekspresyon değerleri Tablo 4.9.'da verilmiştir. AMPAR1 ekspresyonu Sham grubuna göre tDAS ve İR gruplarında anlamlı derecede artmış, İR grubuna göre de İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 4.8. A.). NMDAR1 ve NMDAR2A mRNA ekspresyon değerleri açısından Sham ve tDAS grupları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir. NMDAR1 ekspresyonu sham grubuna göre İR grubunda anlamlı düzeyde artma görülmürken, İR grubuna kıyasla İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında da anlamlı olmayan azalma görülmüştür (Şekil 4.8.B.). NMDAR2A ekspresyonunda ise Sham grubuna kıyasla İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken, İR grubuna göre de İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.8.C.).



Şekil 4.8. Hipokampus dokusunda A) AMPAR1 mRNA ekspresyonları, B) NMDAR1 mRNA ekspresyonları, C) NMDAR2A mRNA ekspresyonları. * p<0.05, *** p<0.001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. #p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

Tablo 4.8. Hipokampus dokusunda AMPAR1, NMDAR1 ve NMDAR2A mRNA ekspresyon bulguları

Gruplar	Sham	tDAS	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
AMPA1 mRNA Ekspresyonu	1.41±0.09	3.12±0.15***	2.09±0.13*	1.24±0.13#	1.33±0.17#
NMDAR1 mRNA Ekspresyonu	1.05±0.05	1.31±0.08	2.07±0.20*	1.62±0.21	1.61±0.12
NMDAR2A mRNA Ekspresyonu	1.31±0.08	1.39±0.17	2.12±0.25*	1.33±0.09#	1.42±0.13#

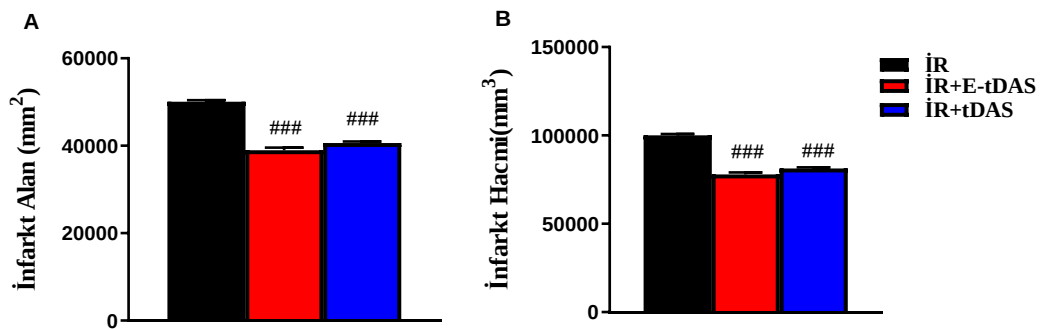
* p<0.05, *** p<0.001, Sham grubuna göre farkı göstermektedir. #p<0.05, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

4.9. İskemik Hasar Bulguları

TTC boyamaları değerlendirildiğinde, sham ve tDAS gruplarında beklendiği şekilde bir infarkt alan olmadığı tespit edilmiş olup, İR uygulanan deney gruplarının verileri değerlendirilmiş olup, bu gruplara ait infarkt alanı ve infarkt hacim değerleri Tablo 4.10.'da verilmiştir. İR grubuna göre İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının infarkt alan (Şekil 4.10.A.) ve hacim (Şekil 4.10.B.) değerlerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. İR+tDAS ve İR+E-tDAS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmamıştır.



Şekil 4.9. Tüm grupların TTC boyamaları



Şekil 4.10. İskemik hasar bulguları. A) İnfarkt alan bulguları, B) İnfarkt hacim bulguları. ### p<0.001, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

Tablo 4.9. İskemik hasar bulguları

Gruplar	İR	İR+E-tDAS	İR+tDAS
İnfarkt Alan (mm ²)	50057±378,89	38969±589,94###	40649±323,13###
İnfarkt Hacmi (mm ³)	100114±757,78	77939±1179,87###	81299±646,26###

###p<0.001, İR grubuna göre farkı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Serebrovasküler hastalıklar beyni besleyen damarlarda veya kanın özelliklerinde oluşan değişikliklere bağlı olarak damarların tıkanması ya da kanaması sonucu görülen merkezi sinir sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Serebrovasküler hastalıklar hastanede tedavi gerektiren nörolojik hastalıkların %80'inden fazlasını meydana getirmekte ve bunun % 87'sini iskemik, %13'ünü ise hemorajik inme oluşturmaktadır. Ülkemizde her yıl 132.000 inme vakasının olduğu rapor edilmiştir (Kablan, 2018). Gelişmiş ülkelerde tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi, inmenin sebep olduğu ölüm oranlarında azalmayı da beraberinde getirmektedir. Bundan dolayı inme hastalığında, iskemi sonrası reperfüzyon hasarını önleyerek, hastaların iyileşmesini hızlandıracak tedavi yöntemlerin geliştirilmesi esastır. İskemi reperfüzyonun tedavisi için yeni ajanların keşfedilmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için deneysel hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (Gupta ve Briyal, 2004; Singh ve Chopra, 2013). Bu nedenle çalışmamızda literatürde yaygın olarak kullanılan orta serebral arter oklüzyon (OSAO) modeli uygulanmış ve 90 dk iskemi oluşturulduktan sonra tıkanmanın kaldırılması ile reperfüzyon sağlanmıştır (Hossmann, 2012).

Klinikte yapılan çalışmalarda, tDAS'ın Parkinson hastalığında motor fonksiyon ve kısmi bilişsel iyileşmeyi sağlamak (Broeder ve ark., 2015), inme hastalarında beyin aktivitesini modüle etmek (Fregni ve ark., 2005) ve Alzheimer hastalarında çalışan bellek performansını iyileştirmek amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (Marceglia ve ark., 2016). Jiang ve ark. (Jiang ve ark., 2012) OSA oklüzyon modelini kullanarak sıçanlara 0.1 mA anodal uyarımının hem motor fonksiyonları iyileştirdiğini hem de nöronal plastisiteyi arttırdığını göstermişlerdir. Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda OSA oklüzyonu ile fokal serebral iskemi oluşturulan sıçanlarda tDAS uygulamasının tedavi edici etkinliğinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Elektriksel stimülasyon 1950'lerden beri nöronal aktiviteyi uyarmada kullanılmaktadır (Esmailpour ve ark., 2017; Stafford ve ark., 2018). Terzuolo ve Bullock (Terzuolo ve Bullock, 1956) yaptıkları çalışmada, aksiyon potansiyeli eşik değerinin altındaki uyarımın nöronun dinlenme potansiyelini değiştirdiklerini göstermişlerdir. Bindman ve ark. (Bindman ve ark., 1964) beyne polarize doğru akımın uyarımından birkaç saat sonra nöronal ateşleme hızında değişiklik oluştuğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar tDAS'ın polarite, akım yoğunluğu, stimülasyon süresi ve elektrot

yerleşimlerine bağlı olarak kalıcı kortikal uyarılarda değişikliğe neden olduğunu göstermiş ve yeni araştırmalara yol açmıştır (Nitsche ve Paulus, 2000; Bikson ve ark., 2016; Kronberg ve ark., 2017). Yoon ve ark. (Yoon ve ark., 2016) travmatik beyin hasarlı sıçanlara 1 ve 2 hafta boyunca 0.2 mA 20 dk. anodal tDAS uyarımı uygulaması sonrası özellikle 2 hafta uyarım yapılan grubun davranış deneylerinin sonucuna göre hem motor fonksiyonlarda hem de uzaysal hafızada iyileşme olduğunu ve beyin derive nörotrofik faktör (BDNF) düzeyindeki artma ile beraber infarkt alanlarında azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Yu ve ark. (Yu ve ark., 2019) sıçanlara 7 gün boyunca 0.5mA 30 dk. anodal tDAS uyarımı sonrası hipokampal CA1 bölgesinde BDNF ekspresyonlarında artış, BDNF/ Tropomyosin reseptör kinaz B sinyal yolağı aktivasyonu ile uzun süreli güçlendirme ve hafızada güçlenme olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Braun ve ark. (Braun ve ark., 2016) 60 dakika OSAO ile fokal iskemi modeli ile oluşturulan iskemik sıçanlara 16 gün boyunca 0.5 mA 15 dk. hem anodal hem de katodal olmak üzere ayrı tipte tDAS uyarısının farklı hücresel yollarla motor fonksiyon iyileşmesini hızlandırdığını ve nöroenezisi arttırdığını ifade etmişlerdir. Yapılan literatür araştırmalarına baktığımızda tDAS uyarımının süresine, polaritesine ve tipine göre etkilerinin değişmekte olduğu görülmektedir. Bundan dolayı uyarı tipi ve süresini belirlemek için 12 sıçan iskemi/reperfüzyon, 0.5 mA anodal tDAS ve 0.5 mA katodal tDAS olmak üzere 3 gruba ayrılarak ön çalışma yapılmıştır. Ön çalışma sonrası hipokampus dokularında iskemide kilit rol oynayan glutamat ve glutamin düzeylerine bakılarak 0.5 mA anodal uyarımının iskemi esnasında artan glutamat miktarını azalttığı tespit edildiğinden anodal uyarımının daha iyi olacağı sonucuna varılmış ve deneylerimizde tedavi grubunda 0.5 mA anodal tDAS uyarımı kullanılmıştır.

İnme sonrası kişilerde yürüme bozukluğu, lokomotor aktivitede azalma gibi motor fonksiyon bozuklukları görülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda fokal iskemi sonrası lokomotor aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (Hattori ve ark., 2000; Tomac ve ark., 2002; Ji ve ark., 2007; Shen ve Wang, 2010). Wang ve ark. (Wang ve ark., 2003) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada serebral infarkt alanının büyüklüğü arttıkça lokomotor aktivitenin azaldığını ve nöroprotektif tedavi sonrası iskemik infarkt alanının azalması ile birlikte lokomotor fonksiyonlarının iyileştiğini bildirmişlerdir. Shen ve Wang (Shen ve Wang, 2010) yaptıkları çalışmada sıçanlarda oluşturdukları geçici OSAO modeli ile iskemik hasarın büyüklüğü ve lokomotor aktivite arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da literatürdeki bulguları destekler

nitelikte, lokomotor aktiviteyi değerlendirdiğimiz açık alan testinde, İR'ye bağlı olarak alınan toplam yol, ortalama hız ve girilen kare sayısı parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Feng ve ark. (Feng ve ark., 2020) parkinson oluşturdukları sıçanlarda yaptıkları çalışmada, 0.3 mA anodal tDAS uyarımının nöroprotektif etkiler göstererek motor fonksiyonu iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Biz de çalışmamızda İR gruplarına tDAS uyguladığımızda literatürdeki bilgileri destekler nitelikte motor fonksiyonların düzeldiğini tespit ettik.

Davranışsal ve bilişsel fonksiyon kaybı iskemi sonrası görülen en yaygın semptomlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Kumral, 2011). Çünkü öğrenme ve hafızanın merkezi olarak kabul edilen hipokampus iskemik hasara karşı oldukça savunmasız ve hassas olmakla birlikte, hipokampusun alt bölgelerinin iskemik hasara duyarlılıkları oldukça farklılık göstermektedir (Butler ve ark., 2002). Hipokampal CA1 nöronları en savunmasız bölge olmakla birlikte uzaysal hafıza ve öğrenmenin temelini de oluşturmaktadır (Morris ve ark., 1982). İskemi sonrası hipokampal CA1 bölgesinde oluşan nöronal hasar sonucu öğrenme ve hafızanın bozulduğu bilinmektedir (Sharifi ve ark., 2013). Özellikle yapılan çalışmalarda iskemi sonrası sıçanlarda uzaysal hafıza ve öğrenme bozuklukları yaygın olarak görülmektedir (Sharifi ve ark., 2013). Schimidt ve ark. (Schimidt ve ark., 2014) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, iskemi sonrası öğrenmenin değerlendirildiği yeni obje tanıma testinde yeni objede geçirilen sürenin iskemi/reperfüzyon grubunda azaldığını yani öğrenme ve hafızanın bozulduğunu rapor etmişlerdir. Literatürdeki çalışmalara benzer olarak çalışmamızda öğrenmenin değerlendirildiği yeni obje tanıma testinde, obje lokalizasyon testi ve Y-maze testi parametrelerinin IR grubunda azaldığı görülmüştür. Yang ve ark. (Yang ve ark., 2019) Alzheimer sıçan modelinde 0.2 mA anodal tDAS uygulamasının morris su tankı testinde hedef kadrandan geçme sayısını anlamlı derecede yükselttiğini, tDAS uyarımının öğrenme ve hafızayı arttırdığını bildirmişlerdir. Yoon ve ark. (Yoon ve ark., 2016) ise travmatik beyin hasarı oluşturdukları sıçanlarda uzaysal hafızayı barnez maze ile değerlendirmiş ve bozulan uzaysal hafızanın 0.2 mA anodal tDAS uyarımıyla iyileştiğini bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda, İR sonrası tDAS uygulamasının hem yeni obje tanıma testi hem de obje lokalizasyon testi ve Y-maze testi parametrelerini artırdığını yani öğrenme ve hafıza üzerinde tDAS'ın olumlu etkilerinin olduğunu tespit ettik. Öğrenme ve hafıza deneyleri sonuçlarımız literatür verileri ile örtüşmektedir.

İskemi sonrası uygulamış olduğumuz 0.5 mA anodal uyarımın bozulan öğrenme ve hafızayı iyileştirdiğini söyleyebiliriz.

Glutamat, memelilerin beyinde hücre içi iletişim, sinaptik plastisite, hücrenin büyüme ve farklılaşması yanı sıra nöronal ve glial hücre ölümünde de rol oynayan en önemli eksitatör nörotransmitterdir. Glutamat, NMDA gibi Ca^{+2} kanal reseptörlerini uyararak iskemik nöronal hasarına ve hücre içi Ca^{+2} artışına yol açarak enzimatik hücre ölümü ile sonuçlanan olayları tetiklemektedir (Lipton ve Rosenberg, 1994; Pulsinelli, 1995). Yapılan hayvan inme modellerinde, fokal serebral iskemi sonrası ekstrasellüler alanda yüksek konsantrasyonda glutamat, aspartat, taurin ve glisin gibi ekstatör amino asit varlığı tespit edilmiştir (Matsumoto ve ark., 1993; Uchiyama-Tsuyuki ve ark., 1994). Özellikle iskeminin kor bölgesinde glutamat düzeyinde normal fizyolojik koşullara göre 80 katlık artış olduğu rapor edilmiştir (Hillered ve ark., 1989). Glutamat ve reseptörleri, iskemi anında ekstrasellüler kısımda aşırı glutamat artışı ve postsinaptik kısımdaki glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu glutamat-kalsiyum toksisitesine sebep olduğundan iskemi patolojisinde hayati rol oynamaktadır. Pascual ve ark. (Pascual ve ark., 1998) sıçanlar üzerinde OSAO modeli kullanarak yaptıkları çalışmada, 60 dakikalık fokal iskemi sonrası nöron, astrosit ve ekstrasellüler sıvıda glutamat, glutamin ve gama aminobütirik asit (GABA) düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Goldberg ve ark. (Goldberg ve ark., 1988) glutamat toksisitesi ile ilişkili kortikal nöronlarda hipoksik hasar gibi patolojik durumlarda glutamat artışı ile beraber glutamin konsantrasyonunun da arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, iR grubunda hipokampus dokusunda glutamat ve glutamin düzeylerinin arttığı tespit edilmiş olup, sonuçlarımız literatürde rapor edilen bilgileri destekler niteliktedir. Glutamatın iskemi sonrası 6-8 saat aralığında arttığı ve iskemi sonrası ilk 4 saatte glutamat artışının oluşmaya başladığı (Nishizawa, 2001; Hossmann, 2012) bilindiğinden, çalışmamızda tDAS uygulaması İR+tDAS grubuna iskemiden 24 saat sonra, İR+E-tDAS grubuna ise tedavinin erken etkisini görmek için iskemiden 2 saat sonra uygulanmıştır. Bir haftalık tDAS uygulama sonrası İR grubuna kıyasla İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında glutamat ve glutamin düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. İR+E-tDAS grubunun glutamat ve glutamin düzeylerinde, İR+tDAS grubunun değerlerinden daha fazla azalma olmuş ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Serebral iskemi hayvan modeli kullanılarak yapılan çalışmada, glutamat seviyelerindeki azalmanın nöronal hasarı ve infarkt hacmini azalttığı ve davranışsal

iyileşmelere katkı sağlayarak glutamat taşıyıcıları için koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir (Krzyzanowska ve ark., 2014). Bu bilgilerin ışığında verilerimizi değerlendirdiğimizde, tDAS sonrası glutamat ve glutamin düzeylerindeki azalmanın, nöronal hasarı ve infarkt hacmini azalttığı ve davranışsal iyileşmelere katkı sağladığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Veziküler glutamat taşıyıcıları, glutamatın sinaptik veziküllerde paketlenmesinden sorumludur ve hipoksik hasar, stres gibi çeşitli durumlardan sonra VGLUT seviyelerinde artış gözlenmektedir (Daniels ve ark., 2011). Bu tür aşırı VGLUT ekspresyonu, vezikülden salınan glutamat miktarında artış ile sonuçlanmaktadır (Daniels ve ark., 2011). Kim ve ark. (Kim ve ark., 2005) 90 dakikalık hipoksik iskemi sıçan modelinde VGLUT1 protein düzeyinde iskemiden 4 ay sonra bile kontrole göre hem lezyonlu hem de lezyonsuz hipokampusta anlamlı artış olduğunu ve bunun da glutamat salınımındaki artıştan dolayı glutamaterjik uyarımın artmasına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Hu ve ark. (Hu ve ark., 2017) da fareler üzerinde yaptıkları çalışmada iskemi sonrası artan glutamat düzeyini azaltmak için iskemik hasarın 7. gününde VGLUT1 ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da iskemi sonrası 7. günde VGLUT1 mRNA ekspresyonunda anlamlı artışın olduğu, bu verinin Hu ve ark. sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür. Bu durum iskemiye bağlı olarak artan glutamat ve glutamini depolamak için İR grubunda VGLUT1'in daha fazla eksprese olduğu şeklinde açıklanabilir. Bunun yanı sıra iskemi sonrası tDAS uygulamasının İR grubuna kıyasla İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının VGLUT1 mRNA ekspresyonunu azalttığı fakat sadece İR+E-tDAS grubundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Mevcut çalışmamızda İR+tDAS ve İR+E-tDAS tDAS uyarım gruplarındaki VGLUT1 mRNA ekspresyonlarının azalma nedenini VGLUT1 ekspresyonundaki değişimin glutamat salınımına bağlı olmasından dolayı İR+tDAS ve İR+E-tDAS grupların glutamat düzeylerinin anlamlı seviyede düşmesinden dolayı açıklayabiliriz.

Hem astrositlerde hem de nöronlarda bulunan EAAT'lar glutamat regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (Krzyzanowska ve ark., 2014). EAAT'lerin genel işlevi, hücre dışı glutamat düzeyini düzenlemek ve eksitotoksisteyi önlemek için glutamat seviyesini fizyolojik aralıkta tutmaktır (Krzyzanowska ve ark., 2014). Glutamat sinaptik aralığa salındıktan sonra, EAAT'ler aracılığıyla glial hücrelere ve nöronlara geri alınmaktadır (Krzyzanowska ve ark., 2014). EAAT'lerin fonksiyonunun

bozulmasından kaynaklanan glutamat artışı nöronal hasara yol açmaktadır (Krzyzanowska ve ark., 2014). Merkezi sinir sisteminde EAAT1, EAAT2 ve EAAT3'ün en önemli glutamat taşıyıcıları oldukları bilinmektedir (Tymianski ve ark., 1993; Mori ve Mishina, 1995; Sucher ve ark., 1996). Yin ve ark. (Yin ve ark., 1998) sıçanlar üzerinde yaptığı fokal iskemi çalışmasında sham grubuna kıyasla iskemi grubunda serebral korteksin piramidal katmanlarında EAAT1 mRNA ekspresyonunun iskemi sonrası 3., 12. ve 24. saatlerinde azaldığı, 72. saatinde ise arttığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da literatürdeki bilgilere benzer şekilde, İR grubunun EAAT1 mRNA ekspresyonunda anlamlı artışın olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki bilgiler ile benzerlik gösteren İR grubundaki EAAT1 ekspresyon artışının nedeni olarak iskeminin yol açtığı hücre hasarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. tDAS uyguladığımız İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarının hipokampus EAAT1 mRNA ekspresyonlarının IR grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüş olup, EAAT1'deki bu düşüşün tDAS uyarımı sonrası sinaptik aralıkta glutamatın azalması ile ilişkili olduğu ve bu sonucun tDAS uygulaması sonucu glutamat düzeyindeki azalmayla örtüştüğü şeklinde değerlendirilmiştir.

Astroglial EAAT2 ve EAAT3 taşıyıcıları sinaptik aralıktan glutamati uzaklaştırarak, glutamatın nörotoksik seviyenin altında tutulmasında kritik rol oynamaktadırlar (Yeh ve ark., 2005). Geçici global iskeminin astrosit glutamat taşıyıcı fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu ve bunun da hücre dışı glutamat seviyesinin yükselmesine ve ardından eksitotoksositeye yol açabileceği düşünülmektedir (Yeh ve ark., 2005). Bazı çalışmalar geçici iskemi sonrası kortekste ve hipokampusta EAAT2'de azalma olduğu, EAAT3 ve EAAT1 düzeylerinde ise artış veya azalış olduğu rapor edilmiştir (Kang ve ark., 2001; Rao ve ark., 2001; Ketheeswaranathan ve ark., 2011; Vandenberg ve Ryan, 2013). Bununla birlikte, baskın glutamat taşıyıcı olan EAAT2'deki azalmanın glutamatın gliaya alım hızını azalttığı ve uzun bir eksitotoksik yanıtı sebep olduğu bilinmektedir (Vandenberg ve Ryan, 2013). Histopatolojik değerlendirmelerde, reperfüzyondan sonra 3., 5. ve 7. günlerde CA1 hipokampal bölgesindeki nöronların progressif kaybı görülmüş ve EAAT2 fonksiyon bozukluğunun da hipokampal nöron ölümüne neden olduğunu bildirilmiştir (Raghavendra ve ark., 2000; Chen ve ark., 2005; Yeh ve ark., 2005). Yapılan başka çalışmalarda da EAAT2 mRNA ekspresyonunun OSAO'dan sonraki 24. ve 72. saatlerde anlamlı derecede azaldığı rapor edilmiştir (Rao ve ark., 2001; Ketheeswaranathan ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da literatürdeki

verilere benzer olarak, İR grubunda EAAT2 mRNA ekspresyonunda anlamlı azalma görülmüştür. tDAS uyarımının İR+tDAS ve İR+E-tDAS gruplarında EAAT2 mRNA ekspresyonunu anlamlı seviyede arttırdığı görülmüştür. EAAT2, glutamat konsantrasyon artışında rol oynadığından inmenin ilk zamanlarında nörolojik kötüleşmeyi daha da arttırdığı rapor edilmiştir (Mallolas ve ark., 2006). Ouyang ve ark. (Ouyang ve ark., 2007) sıçanlarda iki damar oklüzyon modelini kullanarak geçici global iskemi ile hipokampal CA1 nöronlarda EAAT2'nin hızlı bir şekilde azaldığını ve buna bağlı olarak CA1'de mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin arttığını ve de serbest radikallerin bu artışının nöronal hasarı oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında İR+tDAS ve İR+E-tDAS uyarı gruplarının EAAT2 ekspresyonunun İR grubuna kıyasla daha yüksek olması glutamat konsantrasyonunu azaltarak nöronal hasara karşı nöroprotektif etki gösterebileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

İskemik koşullarda sinaptik bölgede glutamatın aşırı arttığı durumlarda EAAT3 önemli role sahiptir (Bianchi ve ark., 2014). EAAT3 glutamat yanı sıra sisteini de taşımakta ve sistein alımı yoluyla en önemli hücre içi antioksidanlardan biri olan glutatyonun sentezine katkıda bulunmaktadır (Bianchi ve ark., 2014). Ayrıca, EAAT3 uzun süreli güçlendirme ve dolayısıyla bellek ve daha yüksek serebral fonksiyonlarda rol oynamaktadır (Bianchi ve ark., 2014). EAAT3'ün iskemi koşullarda nöroprotektif olduğu ve ekspresyonundaki artışın iskemik hasarı sınırlandırdığı rapor edilmiştir (Bianchi ve ark., 2014). EAAT3 geni susturulmuş deneklerde, global serebral iskemi (Won ve ark., 2010) ve fokal serebral iskemiden sonra hipokampal ve kortikal nöron ölümünün arttığı bildirilmiştir (Li ve Zuo, 2011). Bizim çalışmamızda, OSAO yapılan tüm deney gruplarında EAAT3 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Fakat iskemi sonrası tDAS uygulaması EAAT3 mRNA ekspresyonunda bir miktar artış yaratmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Guo ve ark. (Guo ve ark., 2012) global serebral iskemi sıçan modelinde iskemiden en çok etkilenen hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerinde EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 glutamat taşıyıcılarının ekspresyonlarının iskeminin 6., 24., 48. ve 72. saatleri ile 5. ve 7. günlerinde analiz etmişler ve taşıyıcıların 72. saate kadar azaldığını, 3.-7. günler arasında ise glutamat taşıyıcılarının arttığını rapor etmişlerdir. Özellikle iskemiden en çok etkilenen hipokampal CA1 alanında artışların görüldüğü bildirilmiştir. Guo ve ark. (Guo ve ark., 2012) yaptıkları çalışma ile EAAT seviyelerinin iskemiden sonra günlere bağlı olarak değiştiği ve ilk 72 saatteki değişimin

nekroz kaynaklı, 3.-7. günlerdeki değişimin ise apoptoz kaynaklı olduğunu ifade etmişlerdir. Hipokampal CA1, CA2 ve CA3 alanlarında ise EAAT mRNA ekspresyonları 3., 12., 24. ve 72. saatlerinde artış olduğu CA4 ve DG katmanlarında ise önce azalma sonra artış olduğunu bildirmişlerdir (Yin ve ark., 1998). Chen ve ark. (Chen ve ark., 2005) 20 dk. geçici global serebral iskemi yaptıkları sıçanlarda iskemi reperfüzyonun 7. gününde hipokampal (CA1 bölgelerinin) EAAT1 ve EAAT3 protein düzeylerinin arttığını, ancak EAAT2 seviyesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Biz de iskemi sonrası tDAS uyarımının hipokampus dokularında EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 ekspresyonlarını düzenleyerek iskeminin yol açtığı apoptoz ve nekroz üzerine etki ederek nöronal hasara karşı koruyucu mekanizma olarak görev almış olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Eksitator amino asit reseptörlerinin, serebral iskeminin yol açtığı nöronal hücre ölümünde rol oynadığı bilinmekte olup, iskemiye karşı en çok savunmasız beyin bölgeleri olan neokorteks ve hipokampus NMDA ve AMPA reseptörleri açısından zengindir (Sommer ve Seeburg, 1992; Besancon ve ark., 2008). Öğrenme, hafıza gibi önemli işlevlerde rol alan AMPAR1 ve AMPAR2 reseptörleri, iskemi sürecinde nöronal ölümlerin çokça görüldüğü hipokampal CA1 ve CA3'te yaygın olarak bulunmaktadır (Maria ve ark., 2015). AMPAR1, AMPAR3 ve AMPAR4 Ca^{+2} geçirgenken, AMPAR2 reseptörü Ca^{+2} 'ye geçirgen değildir (Pellegrini-Giampietro ve ark., 1997). Ca^{+2} iyonuna karşı en yüksek geçirgenliğe sahip AMPA reseptörleri hipokampal CA1 bölgesinde bulunmakta ve bu bölge iskemiden en fazla etkilenen hipokampal bölgedir (Tanaka ve ark., 2000; Tang ve Xing, 2013). Bundan dolayı iskemi sonrası hücre ölümünden AMPAR1 daha çok sorumlu tutulmaktadır. Kwak ve Weiss (Kwak ve Weiss, 2006) yaptıkları çalışmada, AMPAR1 Ca^{+2} 'a iyonlarına geçirgen olması ve aşırı ekspresyonlarının iskemiye bağlı nöron ölümünde rol oynadığını göstermişlerdir. Nitekim, Ca^{+2} 'a geçirgen AMPA reseptörlerinin blokajının beyindeki iskemiye bağlı nöron ölümünü azalttığı bilinmektedir (Noh ve ark., 2005). Apoptotik in vitro hipokampal hücre kültürü çalışmalarında, ekstrasellüler glutamat artışı ve glutamat taşıyıcılarının bozulmasından özellikle AMPAR1 reseptörünün rol oynadığı gösterilmiştir (Glazner ve ark., 2000; Lu ve ark., 2002). Bizim bulgularımız literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermekte olup, İR sonrası AMPAR1 ekspresyonunda anlamlı artışın olduğu ve İR sonrası tDAS uygulamasının bu artışı azalttığı görülmüştür. Stafford ve ark. 2018 yılında sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada

bir defa 30 dk. 0.25 mA anodal uyarımının hipokampusta kontrole göre stimulus grubunun sinaptik AMPAR1 reseptörünün hem protein düzeyini hem de fosforilasyonunu arttırdığını, sitozolik AMPAR1 reseptörünü ise azalttığını göstermişlerdir (Stafford ve ark., 2018)

Glutamatın iyonotropik NMDA ve AMPA reseptörlerine bağlanması iskemi esnasında daha fazla Ca^{+2} girişine yol açmaktadır (Mergenthaler ve ark., 2004; Simard ve ark., 2007). AMPAR'ler sadece Ca^{+2} geçirgenliğini etkileyen önemli bir faktör olmamakla birlikte aynı zamanda NMDA reseptör aktivasyonunun düzenlenmesinde de görevlidirler (Malinow ve Malenka, 2002). Ca^{+2} geçirgenliği olmayan AMPAR2 reseptörü nöronun depolarizasyonunu sağlayarak NMDAR üzerindeki Mg^{+2} blokajını kaldırarak NMDA reseptörünün aktivasyonunu sağlayıp eksitotoksisitede dolaylı etki göstermektedir (Maria ve ark., 2015). Bu reseptörlerin aktivasyonu iskemik beyin hasarına yol açan Ca^{+2} toksisitesinde kritik rol oynamaktadır (Monaghan ve ark., 1989; Collingridge ve Singer, 1990). Yapılan birçok çalışmada, NMDA reseptörlerinin uyarılmasının, serebral iskemide hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Siciliano ve ark., 1996; Kumari ve Ticku, 2000; Zheng ve ark., 2008). Gerbil ve sıçanlar üzerinde yapılan serebral iskeminin NMDAR ekspresyonunu değiştirdiği bildirilmiştir (Friedman ve ark., 2001; Kang ve ark., 2001; Won ve ark., 2001). İskemik bölgede glutamat salınımının artışı veya geri alımının bozulmasına bağlı olarak ekstrasellüler alanda aşırı miktarda glutamat birikimine yol açarak NMDAR'larının aşırı aktivasyonuna ve ardından nöronlara fazla miktarda Ca^{+2} girişi ile beraber hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Rossi ve ark., 2000; Silva ve ark., 2007). Bununla birlikte, iskemik inmede aşırı aktive olduğunda, NMDAR'ler nöronları öldüren toksik yolları başlatmaktadır (Sattler ve ark., 2000; Hardingham ve ark., 2002; Leveille ve ark., 2008; Hardingham, 2009; Lai ve ark., 2011). NMDA reseptörlerinin özellikle akut iskemik inme ile ilişkili beyin hasarında etkili olduğu bilinmektedir. Yine sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada geçici OSAO sonrası NMDA gen ekspresyonunun ve proteinin arttığı gösterilmiştir (Tirapelli ve ark., 2012). Erişkin ön beyinde NMDAR2'nin baskın olarak NMDAR2A ve NMDAR2B alt birimleri mevcuttur ve bu reseptörler farklı farklı görevler üstlenmektedir. NMDAR2A genel olarak sinaptik bölgelerde bulunurken, NMDAR2B ise ekstrasinaptik bölgelerde bulunmaktadır (Han ve ark., 2016). NMDAR2A nöronal sağ kalımda rol oynarken, NMDAR2B ise apoptotik süreçleri başlatarak nöron ölümünde rol oynamaktadır ve bu

nedenle inme veya beyin travması gibi akut beyin hasarından sonra eksitotoksik beyin hasarı üzerinde farklı etkiler göstermektedir (Maragakis ve Rothstein, 2001; M. Chen ve ark., 2008). NMDA reseptörü NMDAR2A geni susturulan farelerin fokal serebral iskemi sonrası kortikal infarktüsünde azalma olduğu bilinmektedir (Morikawa ve ark., 1998; Soundarapandian ve ark., 2005). Zaric ve ark. (Zaric ve ark., 2018) 15 dakikalık geçici global serebral iskemi oluşturdıkları sıçanların hipokampus dokularında reperfüzyonun 48. saatinde VGLUT1, NMDAR1 ve NMDAR2B protein seviyelerinde anlamlı artışın olduğunu fakat NMDAR2A'nın protein seviyelerinin değişmediğini göstermişlerdir. NMDAR1 ve NMDAR2 bulgularımız yapılan literatür sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda da, mevcut literatür verilerine benzer şekilde İR sonrası hem NMDAR1 hem de NMDAR2 mRNA ekspresyonlarında artış olduğu görülmüş ve bu artışın nedeni iskemi/reperfüzyon sonrası artan glutamatın NMDA reseptörlerini aşırı uyarması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İskemi sonrası tDAS uyarımı ise hem NMDAR1 hem de NMDAR2 ekspresyonlarını azaltmış, fakat sadece NMDAR2 ekspresyonunda anlamlı azalmanın olduğu tespit edilmiştir. tDAS uyarımı sonrasında, NMDAR1 ve NMDAR2 ekspresyonlarındaki azalışın, tDAS'a bağlı NMDA reseptörlerinin baskılanması veya glutamat düzeyinin azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- İskemi reperfüzyon sonrasında gelişen öğrenme ve hafıza ile motor performans bozuklukları üzerine anodal tDAS uyarımının düzeltici yönde etkilerinin olduğu,
- tDAS uyarımının iskemi sonrası artan glutamat ve glutamin düzeylerinin azaltarak nöroprotektif sürece katkı sağladığı,
- tDAS uyarımının sinaptik aralıktaki glutamat birikimini engellemek için, hem astrosit hem de nöronlarda glutamatın geri alımından sorumlu glutamat taşıyıcılarını düzenlediği,
- İskemik hasarda kritik rol oynayan AMPA ve NMDA reseptörleri üzerine tDAS uyarımının antagonist gibi davrandığı sonuçları ortaya konmuştur.
- Ayrıca, yapılan boyama ile tDAS uyarımının iskemik alanı sınırlandırdığı gösterilmiştir.
- Çalışmamızın sonuçları tDAS uyarımının sinaptik glutamat düzeyinin düzenlenmesinde nasıl rol oynadığı ile ilgili temel ipuçlarını vermekle birlikte, hem glutamat taşıyıcılarının hem de glutamat reseptörlerinin sürece nasıl katkı sunduğunun ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Özellikle iskemik hasara karşı en savunmasız hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerinde tDAS uyarımının etkisi ayrıntılı olarak araştırılması gereken bir konudur.

KAYNAKLAR

- Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr Med Res Opin.* 2002; 18 Suppl 2: s 9-13.
- Alonzo A, Brassil J, Taylor JL, Martin D, Loo CK. Daily transcranial direct current stimulation (tdcs) leads to greater increases in cortical excitability than second daily transcranial direct current stimulation. *Brain Stimul.* 2012; 5 (3): 208-213.
- Amaral DG, Insausti R. (1990). Hippocampal formation. In P. G. (Ed.), *The human nervous system* (2 nd ed.).
- Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y, Swanson RA. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci.* 2006; 9 (1): 119-126.
- Arul Anandam AP, Loo C. Transcranial direct current stimulation: A new tool for the treatment of depression? *J Affect Disord.* 2009; 117 (3): 137-145.
- Arul Anandam, AP, Loo C, Sachdev P. Transcranial direct current stimulation - what is the evidence for its efficacy and safety? *F1000 Med Rep.* 2009; 1.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61 (6): 657-668.
- Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg.* 1982; 56 (4): 482-497.
- Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science.* 2008; 319 (5870): 1640-1642.
- Balkan S. (2000). Serebral vasküler anatomi. In *Serebrovasküler hastalıklar*, İstanbul: Güneş Kitabevi, (pp. 1-15).
- Barr ML, Klerman JA. The human nervous system. 5th edition ed. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 1988, p: 266-269.
- Bashir S, Yoo WK. Neuromodulation for addiction by transcranial direct current stimulation: Opportunities and challenges. *Ann Neurosci.* 2016; 23 (4): 241-245.
- Belov KD, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 51.
- Benarroch EE. Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology.* 2010; 74 (3): 259-264.
- Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain A M, Chang AR, Cheng S. Stroke Statistics, S. Heart disease and stroke statistics-2018 update: A report from the american heart association. *Circulation.* 2018; 137 (12): e67-e492.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The glycolytic pathway is tightly controlled (5th ed.), New York, W. H. Freeman; 2002, p 643-696.

Berry A, Tomidokoro Y, Ghiso J, Thornton J. Human chorionic gonadotropin (a luteinizing hormone homologue) decreases spatial memory and increases brain amyloid-beta levels in female rats. *Horm Behav.* 2008; 54 (1): 143-152.

Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: Emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29 (5): 268-275.

Bianchi MG, Bardelli D, Chiu M, Bussolati O. Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71 (11): 2001-2015.

Bikson M, Grossman P, Thomas C, Zannou AL, Jiang J, Adnan T, Woods AJ. Safety of transcranial direct current stimulation: Evidence based update 2016. *Brain Stimul.* 2016; 9 (5): 641-661.

Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *J Physiol.* 1964; 172: 369-382.

Blomgren K, Zhu C, Hallin U, Hagberg H. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304 (3): 551-559.

Boehme AK, Esenwa C, Elkind MS. Stroke risk factors, genetics, and prevention. *Circ Res.* 2017; 120 (3): 472-495.

Bogousslavsky J, Van MG, Regli F. The lausanne stroke registry: Analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988; 19 (9): 1083-1092.

Bond A, Lodge D, Hicks CA, Ward M A, O'Neill M J. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J of Pharmacol.* 1999; 380 (2-3): 91-99.

Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg.* 1992; 77 (3): 360-368.

Braun R, Klein R, Walter HL, Ohren M, Freudenmacher L, Getachew K, Rueger MA. Transcranial direct current stimulation accelerates recovery of function, induces neurogenesis and recruits oligodendrocyte precursors in a rat model of stroke. *Exp Neurol.* 2016; 279: 127-136.

Broeder S, Nackaerts E, Heremans E, Vervoort G, Meesen R, Verheyden G, Nieuwboer A. Transcranial direct current stimulation in parkinson's disease: Neurophysiological mechanisms and behavioral effects. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 57: 105-117.

Bruhn T, Levy LM, Nielsen M, Christensen T, Johansen FF, Diemer NH. Ischemia induced changes in expression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 in hippocampus of the rat. *Neurochem Int.* 2000; 37 (2-3): 277-285.

Butler TL, Kassed CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2002; 929 (2): 252-260.

Casetta B, Tagliacozzi D, Shushan B, Federici G. Development of a method for rapid quantitation of amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38 (5): 391-401.

Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996; 27 (6): 1124-1129.

Chen JC, Hsu-Chou H, Lu JL, Chiang YC, Huang HM, Wang HL, Yeh TS. Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group iii metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacol.* 2005; 49 (5): 703-714.

Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xiong ZQ. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke.* 2008; 39 (11): 3042-3048.

Choi D W. Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1994a; 747: 162-171.

Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res.* 1994b; 100: 47-51.

Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11 (7): 290-296.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; 65 (1): 1-105.

Daniels RW, Miller BR, Di Antonio A. Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2011; 41 (2): 415-420.

Davalos, A, Shuaib A, Wahlgren NG. Neurotransmitters and pathophysiology of stroke: Evidence for the release of glutamate and other transmitters/mediators in animals and humans. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2000; 9 (6 Pt 2): 2-8.

De Gracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: Implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22 (2): 127-141.

Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann N Y Acad Sci.* 1969; 159 (3): 852-859.

Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacol.* 2008; 55 (3): 310-318.

Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Dawson VL. Poly(adp-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature medicine*. 1997; 3 (10): 1089-1095.

Escobar I, Xu J, Jackson CW, Perez-Pinzon MA. Altered neural networks in the papez circuit: Implications for cognitive dysfunction after cerebral ischemia. *J Alzheimers Dis*. 2019; 67 (2): 425-446.

Esmailpour Z, Schestatsky P, Bikson M, Brunoni AR, Pellegrinelli A, Piovesan, FX, Fregni F. Notes on human trials of transcranial direct current stimulation between 1960 and 1998. *Front Hum Neurosci*. 2017; 11: 71.

Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: Findings from the global burden of disease study 2010. *Lancet*. 2014; 383 (9913): 245-254.

Feigin VL, Krishnamurthi RV, Parmar P, Norrving B, Mensah GA, Bennett DA. Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990-2013: The gbd 2013 study. *Neuroepidemiology*. 2015; 45 (3): 161-176.

Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global burden of stroke. *Circ Res*. 2017; 120 (3): 439-448.

Feng XJ, Huang YT, Huang YZ, Kuo CW, Peng CW, Rotenberg A, Hsieh TH. Early transcranial direct current stimulation treatment exerts neuroprotective effects on 6-ohda-induced parkinsonism in rats. *Brain Stimul*. 2020; 13 (3): 655-663.

Ferrucci R, Mameli F, Guidi I, Mrakic-Spota S, Vergari M, Marceglia S, Priori A. Transcranial direct current stimulation improves recognition memory in alzheimer disease. *Neurology*. 2008; 71 (7): 493-498.

Floel A, Suttrop W, Kohl O, Kurten J, Lohmann H, Breitenstein C, Knecht S. Non-invasive brain stimulation improves object-location learning in the elderly. *Neurobiol Aging*. 2012; 33 (8): 1682-1689.

Fregni F, Boggio PS, Mansur CG, Wagner T, Ferreira MJ, Lima MC, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuroreport*. 2005; 16 (14): 1551-1555.

Friedman LK, Ginsberg MD, Belayev L, Busto R, Alonso OF, Lin B, Globus MY. Intraischemic but not postischemic hypothermia prevents non-selective hippocampal downregulation of ampa and nmda receptor gene expression after global ischemia. *Mol Brain Res*. 2001; 86 (1-2): 34-47.

Froc DJ, Chapman CA, Trepel C, Racine R J. Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat. *J Neurosci*. 2000; 20 (1): 438-445.

Galvez V, Alonzo A, Martin D, Loo CK. Transcranial direct current stimulation treatment protocols: Should stimulus intensity be constant or incremental over multiple sessions? *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16 (1): 13-21.

Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin J C, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: A possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19 (9): 1020-1028.

Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK, Das N. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e57735.

Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998; 39 (8): 1529-1542.

Glazner GW, Chan SL, Lu C, Mattson MP. Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: A mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci.* 2000; 20 (10): 3641-3649.

Goldberg MP, Monyer H, Choi DW. Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine. *Neurosci Lett.* 1988; 94 (1-2): 52-57.

Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: Critical role for NMDA receptors. *J Neurosci.* 1999; 19 (5): 1657-1662.

Guo F, Sun F, Yu JL, Wang QH, Tu DY, Mao XY, Cai JQ. Abnormal expressions of glutamate transporters and metabotropic glutamate receptor 1 in the spontaneously epileptic rat hippocampus. *Brain Res Bull.* 2010; 81 (4-5): 510-516.

Guo Q, Lan J, Zhang W, Guo P, Guo L, Li Z, Qiu Y. Dynamic expression of cerebral cortex and hippocampal glutamate transporters in a rat model of chest compression-induced global cerebral ischemia. *Neural Regen Res.* 2012; 7 (2): 125-130.

Gupta YK, Briyal S. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2004; 48 (4): 379-394.

Hall JE. Guyton ve hall tıbbi fizyoloji Çeviren: Yeğen BC, Alican İ, Solakoğlu Z. (13.Baskı ed.), Güneş Kitabevi, Ankara; 2017, p: 737-745.

Han XJ, Shi ZS, Xia LX, Zhu LH, Zeng L, Nie JH, Ruan YW. Changes in synaptic plasticity and expression of glutamate receptor subunits in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience.* 2016; 327: 64-78.

Hansen F, Pandolfo P, Galland F, Torres FV, Dutra MF, Batassini C, Goncalves CA. Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiol Behav.* 2016; 164 (Pt A): 93-101.

Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37 (Pt 6): 1147-1160.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARS oppose synaptic NMDARS by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002; 5 (5): 405-414.

Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin.* 2006; 24 (1): 1-21.

Hattori K, Lee H, Hurn PD, Crain BJ, Traystman RJ, De Vries AC. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 2000; 31 (8): 1939-1944.

Hattori Y, Moriwaki A, Hori Y. Biphasic effects of polarizing current on adenosine-sensitive generation of cyclic AMP in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 1990; 116 (3): 320-324.

Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989; 9 (5): 607-616.

Honma S, Kato A, Shi L, Yatani H, Wakisaka S. Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the periodontal ligament of the rat incisor. *Anat Rec.* 2012; 295 (1): 160-166.

Hossmann KA. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: Implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32 (7): 1310-1316.

Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med.* 2004; 4 (2): 131-136.

Hu Y, Zhan Q, Zhang H, Liu X, Huang L, Li H, Yuan Q. Increased susceptibility to ischemic brain injury in neuroplastin 65-deficient mice likely via glutamate excitotoxicity. *Front Cell Neurosci.* 2017; 11: 110.

Isaacson RL. Unsolved mysteries: The hippocampus. *Behav Cogn Neurosci Rev.* 2002; 1 (2): 87-107.

Islam N, Aftabuddin M, Moriwaki A, Hattori Y, Hori Y. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Brain Res.* 1995; 684 (2): 206-208.

Ji HJ, Chai HY, Nahm SS, Lee J, Bae GW, Nho K, Kang JK. Neuroprotective effects of the novel polyethylene glycol-hemoglobin conjugate sb1 on experimental cerebral thromboembolism in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 566 (1-3): 83-87.

Jiang T, Xu RX, Zhang AW, Di W, Xiao ZJ, Miao JY, Fang YN. Effects of transcranial direct current stimulation on hemichannel pannexin-1 and neural plasticity in rat model of cerebral infarction. *Neuroscience.* 2012; 226: 421-426.

Johnston IN, Tan M, Cao J, Matsos A, Forrest D. R. L., Si E, Hutchinson MR. Ibudilast reduces oxaliplatin-induced tactile allodynia and cognitive impairments in rats. *Behav Brain Res.* 2017; 334: 109-118.

Kablan Y. (2018). İnme: Epidemiyoloji ve risk faktörleri, 1-19.

Kang TC, Hwang IK, Park SK, An SJ, Yoon DK, Moon SM, Won MH. Chronological changes of n-methyl-d-aspartate receptors and excitatory amino acid carrier 1

immunoreactivities in ca1 area and subiculum after transient forebrain ischemia. J Neurocytol. 2001; 30 (12): 945-955.

Kannampalli P, Sengupta JN. Role of principal ionotropic and metabotropic receptors in visceral pain. J Neurogastroenterol Motil. 2015; 21 (2): 147-158.

Kaya D, Özdemir YG. (2011). Serebral kan akımı ve metabolizması. In E. Kumral (Ed.), *Santral sinir sisteminin damarsal hastalıkları*. Güneş Kitapevleri.

Ketheeswaranathan P, Turner NA, Spary EJ, Batten TF, Mc Coll BW, Saha S. Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. Brain Res. 2011; 1418: 93-103.

Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Choi HC, Song HK., Kang TC. Bilateral enhancement of excitation via up-regulation of vesicular glutamate transporter subtype 1, not subtype 2, immunoreactivity in the unilateral hypoxic epilepsy model. Brain Res. 2005; 1055 (1-2): 122-130.

Kitamura T, Inokuchi K. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. Mol Brain. 2014; 7: 13.

Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Inokuchi K. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. Cell. 2009; 139 (4): 814-827.

Krishnamurthi RV, Moran AE, Feigin VL, Barker-Collo S, Norrving B, Mensah, GA. Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in adults aged 20-64 years in 1990-2013: Data from the global burden of disease 2013 study. Neuroepidemiology. 2015; 45 (3): 190-202.

Kristian T, Siesjo BK. Calcium-related damage in ischemia. Life Sci. 1996; 59 (5-6): 357-367.

Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke. 1998; 29 (3): 705-718.

Kronberg G, Bridi M, Abel T, Bikson M, Parra LC. Direct current stimulation modulates LTP and LTD: Activity dependence and dendritic effects. Brain Stimul. 2017; 10 (1): 51-58.

Krzyzanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: To modulate or not? Acta Pharmacol Sin. 2014; 35 (4): 444-462.

Kumari M, Ticku MK. Regulation of NMDA receptors by ethanol. Prog Drug Res. 2000; 54: 152-189.

Kumral E. Santral sinir sisteminin damarsal hastalıkları (E. Kumral Ed.); 2011, p: 3-367.

Kuraiwa T, Bonnekoh P, Hossman K. Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 1990; 10: 550-556.

Kutluk K. İskemik inme (1. Baskı ed.). Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 2004, p: 1-35.

- Kwak S, Weiss JH. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Current opinion in neurobiology*. 2006; 16 (3): 281-287.
- Lai TW, Shyu WC, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends Mol Med*. 2011; 17 (5): 266-275.
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 106 (6): 723-731.
- Lee S, Hong Y, Park S, Lee SR, Chang KT, Hong Y. Comparison of surgical methods of transient middle cerebral artery occlusion between rats and mice. *J Vet Med Sci*. 2014; 76 (12): 1555-1561.
- Leveille F, El Gaamouch F, Goux E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J*. 2008; 22 (12): 4258-4271.
- Li H, Yan Z, Zhu J, Yang J, He J. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology*. 2011; 60 (2-3): 252-258.
- Li L, Zuo Z. Glutamate transporter type 3 knockout reduces brain tolerance to focal brain ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31 (5): 1283-1292.
- Liang D, Dawson TM, Dawson VL. What have genetically engineered mice taught us about ischemic injury? *Curr Mol Med*. 2004; 4 (2): 207-225.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*. 1993; 24 (1): 117-121.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994; 330 (9): 613-622.
- Liu F, Mc Cullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 464701.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20 (1): 84-91.
- Lu C, Fu W, Salvesen GS, Mattson MP. Direct cleavage of ampa receptor subunit GLUR1 and suppression of ampa currents by caspase-3: Implications for synaptic plasticity and excitotoxic neuronal death. *Neuromolecular Med*. 2002; 1 (1): 69-79.
- Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 2002; 25: 103-126.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Davalos A. A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med*. 2006; 203 (3): 711-717.

Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol*. 2001; 58 (3): 365-370.

Marceglia S, Mrakic-Sposta S, Rosa M, Ferrucci R, Mameli F, Vergari M, Priori A. Transcranial direct current stimulation modulates cortical neuronal activity in alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2016; 10: 134.

Maria M, Raffaella A, Ennio A, Merylin Z, Gilda F, Marcello C. AMPAergic mechanisms linked to cerebral ischemia. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases*. 2015; 2 (478).

Marquez-Ruiz J, Leal-Campanario R, Sanchez-Campusano R, Molaee-Ardekani B, Wendling F, Miranda PC, Delgado-Garcia JM. Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (17): 6710-6715.

Matsumoto K, Graf R, Rosner G, Taguchi J, Heiss WD. Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993; 13 (4): 586-594.

Medeiros LF, de Souza IC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, Torres IL. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: A review. *Front Psychiatry*. 2012; 3: 110.

Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1992; 23 (4): 552-559.

Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. *Metab Brain Dis*. 2004; 19 (3-4): 151-167.

Merton PA, Morton HB. Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*. 1980; 285 (5762): 227.

Miller EC, Gatollari HJ, Too G, Boehme AK, Leffert L, Marshall RS, Willey JZ. Risk factors for pregnancy-associated stroke in women with preeclampsia. *Stroke*. 2017; 48 (7): 1752-1759.

Miranda PC, Lomarev M, Hallett M. Modeling the current distribution during transcranial direct current stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2006; 117 (7): 1623-1629.

Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2001; 7 (4): 249-253.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1989; 29: 365-402.

Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*. 1995; 34 (10): 1219-1237.

Morikawa E, Mori H, Kiyama Y, Mishina M, Asano T, Kirino T. Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci*. 1998; 18 (23): 9727-9732.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297 (5868): 681-683.

Mukherjee D, Patil CG. Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg*. 2011; 76 (6 Suppl): S85-90.

Neves JD, Vizuete AF, Nicola F, Da Re C, Rodrigues AF, Schmitz F, Netto CA. Glial glutamate transporters expression, glutamate uptake, and oxidative stress in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurochem Int*. 2018; 116: 13-21.

Nicotera P, Lipton SA. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19 (6): 583-591.

Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*. 2001; 69 (4): 369-381.

Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008; 1 (3): 206-223.

Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000; 527 Pt 3: 633-639.

Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*. 2001; 57 (10): 1899-1901.

Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (34): 12230-12235.

Notturmo F, Pace M, Zappasodi F, Cam E, Bassetti CL, Uncini A. Neuroprotective effect of cathodal transcranial direct current stimulation in a rat stroke model. *J Neurol Sci*. 2014; 342 (1-2): 146-151.

Oğul E. Klinik nöroloji (Birinci Baskı). Nobel&Güneş; 2002, p: 1-47.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4 (7): 552-565.

Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*. 2007; 27 (16): 4253-4260.

Pandya RS, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, Popp AJ, Wang X. Central nervous system agents for ischemic stroke: Neuroprotection mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2011; 11 (2): 81-97.

Parent A. Giovanni aldini: From animal electricity to human brain stimulation. *Can J Neurol Sci.* 2004; 31 (4): 576-584.

Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdan S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998; 29 (5): 1048-1056; discussion 1056-1047.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. The GLUR2 (GLUR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable ampa receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 1997; 20 (10): 464-470.

Penfield W, Boldrey E. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain.* 1937; 60 (4): 389-443.

Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006; 28 (9): 1353-1365.

Pulsinelli WA. The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr Opin Neurol.* 1995; 8 (1): 3-5.

Purpura DP, Mc Murtry JG. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *J Neurophysiol.* 1965; 28: 166-185.

Raghavendra Rao VL, Rao AM, Dogan A, Bowen KK, Hatcher J, Rothstein JD, Dempsey RJ. Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2000; 36 (6): 531-537.

Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and eaac1 expression in rat brain. *Neurochem Res.* 2001; 26 (5): 497-502.

Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Todd KG, Dempsey RJ. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain. *Eur J Neurosci.* 2001; 13 (1): 119-128.

Rea K, Roche M, Finn DP. Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: The role of gaba and glutamate. *Br J Pharmacol.* 2007; 152 (5): 633-648.

Reinhart RM, Cosman JD, Fukuda K, Woodman GF. Using transcranial direct-current stimulation (tdcs) to understand cognitive processing. *Atten Percept Psychophys.* 2017; 79 (1): 3-23.

Roizenblatt S, Fregni F, Gimenez R, Wetzel T, Rigonatti SP, Tufik S, Valle AC. Site-specific effects of transcranial direct current stimulation on sleep and pain in fibromyalgia: A randomized, sham-controlled study. *Pain Pract.* 2007; 7 (4): 297-306.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 2000; 403 (6767): 316-321.

Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A. Metabolism. An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare

professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*. 2013; 44 (7): 2064-2089.

Sahan M, Satar S, Koc AF, Sebe A. İskemik İnme ve akut faz refraktanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010; 19 (2): 85-140.

Salford LG, Plum F, Brierley JB. Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol*. 1973; 29 (4): 234-238.

Sanders RD, Ma D, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2005; 19 (3): 461-474.

Sarıbaş O, Topçuoğlu MA, Arsava EM. Akut İskemik İnmelerde tedavi yaklaşımları (B. S Ed.). Güneş Kitapevi; 2005, p: 289-311.

Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Mac Donald JF, Tymianski M. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic nmda receptors in excitotoxicity. *J Neurosci*. 2000; 20 (1): 22-33.

Schacter DL, Gilbert DT, Wegner DM. *Semantic and episodic memory* (2nd ed.); 2011, p: 240-241.

Schmidt HL, Vieira A, Altermann C, Martins A, Sosa P, Santos FW, Carpes FP. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: Neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiol Learn Mem*. 2014; 114: 242-250.

Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*. 2012; 226 (1): 56-65.

Shahjouei S, Cai PY, Ansari S, Sharififar S, Azari H, Ganji S, Zand R. Middle cerebral artery occlusion model of stroke in rodents: A step-by-step approach. *J Vasc Interv Neurol*. 2016; 8 (5): 1-8.

Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*. 2004; 80 (2): 125-141.

Sharifi ZN, Abolhassani F, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, Movassaghi S. Neuroprotective treatment with fk506 reduces hippocampal damage and prevents learning and memory deficits after transient global ischemia in rat. *Archives of Neuroscience*. 2013; 1: 35-40.

Shen H, Wang Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. *J Neurosci Methods*. 2010; 186 (2): 150-154.

Siciliano JC, Toutant M, Derkinderen P, Sasaki T, Girault JA. Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (pyk2/cakbeta) and pp125(fak) by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J Biol Chem*. 1996; 271 (46): 28942-28946.

Siesjo BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1988; 522: 638-661.

Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: A unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989; 9 (2): 127-140.

Silva MN, Colli BO, Coimbra NC, Coutinho Netto J. Evaluation of the neuroprotective effect of ketoprofen on rats submitted to permanent focal brain ischemia. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65 (4A): 978-984.

Silver IA, Erecinska M. Intracellular and extracellular changes of $[Ca^{2+}]$ in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol.* 1990; 95 (5): 837-866.

Simard JM, Tarasov KV, Gerzanich V. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772 (8): 947-957.

Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36: 83-106.

Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802 (1): 80-91.

Singh DP, Chopra K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 2013; 720 (1-3): 98-106.

Sivenius J, Tuomilehto J, Immonen-Raiha P, Kaarisalo M, Sarti C, Torppa J, Kuulasmaa K, Mahonen M, Lehtonen A, Salomaa V. Continuous 15-year decrease in incidence and mortality of stroke in finland: The finstroke study. *Stroke.* 2004; 35 (2): 420-425.

Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: A therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol.* 2004; 15 (1 Pt 2): S3-12.

Sommer B, Seeburg PH. Glutamate receptor channels: Novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13 (7): 291-296.

Soundarapandian MM, Tu WH, Peng PL, Zervos AS, Lu Y. AMPA receptor subunit GLUR2 gates injurious signals in ischemic stroke. *Mol Neurobiol.* 2005; 32 (2): 145-155.

Squire LR, Zola SM. Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus.* 1998; 8 (3): 205-211.

Stafford J, Brownlow ML, Qualley A, Jankord R. AMPA receptor translocation and phosphorylation are induced by transcranial direct current stimulation in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2018; 150: 36-41.

Stagg CJ, Antal A, Nitsche MA. Physiology of transcranial direct current stimulation. *J ECT.* 2018; 34 (3): 144-152.

Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist*. 2011; 17 (1): 37-53.

Suarez JJ. Outcome in neurocritical care: Advances in monitoring and treatment and effect of a specialized neurocritical care team. *Crit Care Med*. 2006; 34 (9 Suppl): S232-238.

Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi YB, Lipton SA. NMDA receptors: From genes to channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1996; 17 (10): 348-355.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004; 1 (1): 17-25.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*. 2004; 4 (2): 193-205.

Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. The ampar subunit GLUR2: Still front and center-stage. *Brain Res*. 2000; 886 (1-2): 190-207.

Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron*. 2014; 84 (2): 347-354.

Tang XJ, Xing F. Calcium-permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (review). *Biomed Rep*. 2013; 1 (6): 828-832.

Terzuolo CA, Bullock TH. Measurement of imposed voltage gradient adequate to modulate neuronal firing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956; 42 (9): 687-694.

Tirapelli DPC, Carlotti JCG, Leite JP, Lizarte FSN, Tirapelli LF, Colli BO. Analysis of the NMDA in focal cerebral ischemia in rats. *Int. J. Morphol*. 2012; 30 (3): 979-985.

Tomac AC, Agulnick AD, Haughey N, Chang CF, Zhang Y, Backman C, Hoffer BJ. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in persephin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (14): 9521-9526.

Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci*. 1993; 13 (5): 2085-2104.

Uchiyama-Tsuyuki Y, Araki H, Yae T, Otomo S. Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 1994; 62 (3): 1074-1078.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12 (10): 1161-1208.

Valle A, Roizenblatt S, Botte S, Zaghi S, Riberto M, Tufik S, Fregni F. Efficacy of anodal transcranial direct current stimulation (tdcs) for the treatment of fibromyalgia: Results of a randomized, sham-controlled longitudinal clinical trial. *J Pain Manag*. 2009; 2 (3): 353-361.

Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev.* 2013; 93 (4): 1621-1657.

Victor M, Ropper AH. (2001). Cerebrovascular diseases. In *Principles of neurology*. Mc Graw Hill; New York: (Seventh Edition, pp. 821-924).

Wagner BA, Braddick VC, Batson CG, Cullen BH, Miller LE, Spritzer MD. Effects of testosterone dose on spatial memory among castrated adult male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2018; 89: 120-130.

Wagner T, Fregni F, Fecteau S, Grodzinsky A, Zahn M, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: A computer-based human model study. *Neuroimage.* 2007; 35 (3): 1113-1124.

Wang RM, Yang F, Zhang YX. Preconditioning-induced activation of Erk5 is dependent on moderate Ca²⁺ influx via nmda receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal ca1 region of rats. *Life Sci.* 2006; 79 (19): 1839-1846.

Wang Y, Chang CF, Morales M, Chiang YH, Harvey BK, Su TP, Thiernemann C. Diadenosine tetraphosphate protects against injuries induced by ischemia and 6-hydroxydopamine in rat brain. *J Neurosci.* 2003; 23 (21): 7958-7965.

Ward JD, Becker DP, Miller JD, Choi SC, Marmarou A, Wood C, Keenan R. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. *J Neurosurg.* 1985; 62 (3): 383-388.

Webster BR, Celnik PA, Cohen LG. Noninvasive brain stimulation in stroke rehabilitation. *NeuroRx.* 2006; 3 (4): 474-481.

Weinberger J, Cohen G, Nieves-Rosa J. Nerve terminal damage in cerebral ischemia: Greater susceptibility of catecholamine nerve terminals relative to serotonin nerve terminals. *Stroke.* 1983; 14 (6): 986-989.

Wojtowicz JM. Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav Brain Res.* 2012; 227 (2): 490-496.

Won MH, Kang T, Park S, Jeon G, Kim Y, Seo JH, Cho SS. The alterations of n-methyl-d-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the early time after ischemia-reperfusion insult. *Neurosci Lett.* 2001; 301 (2): 139-142.

Won SJ, Yoo BH, Brennan AM, Shin BS, Kauppinen TM, Berman AE, Suh SW. EAAC1 gene deletion alters zinc homeostasis and exacerbates neuronal injury after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2010; 30 (46): 15409-15418.

Woollett K, Maguire EA. Exploring anterograde associative memory in london taxi drivers. *Neuroreport.* 2012; 23 (15): 885-888.

Wyatt J. Applied physiology: Brain metabolism following perinatal asphyxia. 2002; 12: 227-231.

Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke*. 2012; 7 (5): 378-385.

Xiong LZ. Neuroanesthesia and neuroprotection: Where are we now? *Chinese Medical Journal*. 2006; 119 (11): 883-886.

Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol*. 1992; 262 (3 Pt 2): H672-677.

Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol*. 2000; 62 (3): 273-295.

Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, Kominami E. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus*. 2003; 13 (7): 791-800.

Yang WJ, Wen HZ, Zhou LX, Luo YP, Hou WS, Wang X, Tian XL. After-effects of repetitive anodal transcranial direct current stimulation on learning and memory in a rat model of alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 2019; 161: 37-45.

Yeh TH, Hwang HM, Chen JJ, Wu T, Li AH, Wang HL. Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiol Dis*. 2005; 18 (3): 476-483.

Yin KJ, Yan YP, Sun FY. Altered expression of glutamate transporter glast mRNA in rat brain after photochemically induced focal ischemia. *Anat Rec*. 1998; 251 (1): 9-14.

Yoon, K. J., Lee, Y. T., Chae, S. W., Park, C. R., & Kim, D. Y. Effects of anodal transcranial direct current stimulation (tdcs) on behavioral and spatial memory during the early stage of traumatic brain injury in the rats. *J Neurol Sci*. 2016; 362: 314-320.

Yu TH, Wu YJ, Chien ME, Hsu KS. Transcranial direct current stimulation induces hippocampal metaplasticity mediated by brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology*. 2019; 144: 358-367.

Yuan HJ, Zhu XH, Luo Q, Wu YN, Kang Y, Jiao JJ, Lou JS. Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning in rats increases antioxidant activities in cerebral tissue during severe ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2012; 174 (1): 176-183.

Zaric M, Drakulic D, Stojanovic IG, Mitrovic N, Grkovic I, Martinovic J. Regional-specific effects of cerebral ischemia/reperfusion and dehydroepiandrosterone on synaptic NMDAR/PSD-95 complex in male wistar rats. *Brain Res*. 2018; 1688: 73-80.

Zhang L, Andou Y, Masuda S, Mitani A, Kataoka K. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci Lett*. 1993; 158 (1): 105-108.

Zhang Y, Chen ZW, Girwin M, Wong TM. Remifentanyl mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein kinase c activation in open chest of rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26 (5): 546-550.

Zheng Z, Kim JY, Ma H, Lee JE, Yenari MA. Anti-inflammatory effects of the 70 kda heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28 (1): 53-63.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Güven	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	AKÇAY	Tel no	05388352041
Doğum tarihi	05.10.1985	e-posta	guvenakcayibu@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Esenyurt Lisesi	2005
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Matematik Bölümü	2011
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü- Çift Anadal	2011
Pedagojik Formasyon	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim Fakültesi	2012
Yüksek Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı	2013
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik	2020

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Bursiyer	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2010-2013
Araştırmacı	Institute Of Metal Physics, Ekaterinburg, Russia	2013-2013
Araş. Gör.	Hitit Üniversitesi- Tıp Fakültesi	2014-2015
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi- Tıp Fakültesi	2015-2020

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	76.25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Influence Of Correlation Effect On The Electronic Structure Of Superducting Pnictidematerials	TÜBİTAK Uluslararası Projesi	2012-2013
Kronik Deltametrin Uygulaması Sonrası Sirinjik Asidin Hipokampus ve Öğrenme Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017-2018
Yaşlı Ratlarda L_karnitin Presbiakuzi Üzerine Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarla Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017-2020
Yaşlılığa Bağlı Öğrenme Değişikliklerine L_karnitin Etkisi ve Moleküler Mekanizmaları	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017-2020
Prenatal, Postnatal Sülfid Maruziyetinin Davranış ve Öğrenme Üzerine Etkilerinin ve Moleküler Mekanizmasının Araştırılması	TÜBİTAK 1001 Projesi	2017-2019
Nöropeptit-S'in Parkinson Hastalığındaki Tedavi Edici ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması	TÜBİTAK 1003 Projesi	2017-2019
Farklı Dozlardaki Sülfidin Öğrenme ve Hafıza Üzerindeki Etkilerinde Asetilkolinin Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2020
Yaşlılığa Bağlı Oluşan Oksidatif Stres ve Apoptotik Parametrelerin Moleküler Mekanizmaları Üzerine L Karnitin Uygulamasının Etkileri.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2020
Sıçanlarda 2100 Mhz Frekansında Farklı Dozlarda Rf-ema Uygulamasının Öğrenme Performansı ve Kolinergic Yolaktaki Etkilerinin Davranışsal Testler ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2020
Sirkadiyen Saat Genlerinin Ekspresyonunun Fare Normal Plasenta ve Sirkadiyen Ritmi Bozulan Plasenta Gelişiminde Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2020

Fare Meme Kanseri Modelinde Karsinogenik Yanıtlara Karşı Ortaya Çıkacak Anksiyete Ve Depresyonun Düzenlenmesinde Melatoninin Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018-2020
Rotenon İle Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortiksetinin Nörodejenerasyon ve Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin İn Vivo Olarak İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2019-2020
Sirkadiyen Ritmi Bozulan Gebe Farelerde Oluşan Uterus İçi Büyüme Geriliğinin Mekanizmasının Araştırılması	TÜBİTAK 1001 Projesi	2019-2020

Burslar-Ödüller:

- Poster Sunum İkincilik Ödülü, 45.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ekim-3 Kasım 2019.
- 55. Ulusal Nöroloji Kongresi Katılım Bursu, Antalya,15-21.11.2019.
- Student Travel Award, 7th Rederetion of European Neuroscience Societies-Regional Meeting (FRM-2019), Belgrade, Serbia, 10-13th July 2019.
- Sözlü Sunum Birincilik Ödülü, V. Cerrahpaşa Bilim Günleri, 2018.
- TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu, 2014.
- TÜBİTAK Uluslararası Proje, 2012-2013, Bursiyer.
- TÜBİTAK 1001 Proje, 2018-2019, Bursiyer.
- TÜBİTAK 1001 Proje, 2019-2020 , Bursiyer.

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler, bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1) Osman Sinen, Mehmet Bülbül, Narin Derin, Ayse Ozkan, **Guven Akcay**, Mutay Aydın Aslan & Aysel Agar. “The effect of chronic neuropeptide-S treatment on non-motor parameters in experimental model of Parkinson’s disease”, International Journal of Neuroscience, 22 May 2020, DOI: 10.1080/00207454.2020.1754213.
- 2) Ogut E, Sekerci R, **Akcay G**, Yildirim FB, Derin N, Aslan M, Sati L.” Protective effects of syringic acid on neurobehavioral deficits and hippocampal tissue damages induced by sub-chronic deltamethrin exposure.” Neurotoxicol Teratol. 2019 Oct 20:106839. doi: 10.1016/j.ntt.2019.106839.
- 3) Kelek S E, Afşar E, **Akcay G**, Danışman B, Aslan M.” Effect of chronic L-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic

markers in peripheral organs of adult Wistar rats.” Food Chem Toxicol. 2019 Sep 27;134:110851. doi: 10.1016/j.fct.2019.110851.

- 4) **Akçay G**, Danişman B, Tas G G, Satı G L, Derin N, Derin A T, “Investigation of protective effects of long term L-carnitine treatment on presbycusis”, An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Volume 12 / Supplement 1 / May,2018.
- 5) **Akçay G**, Danişman B, Kıymaz K Z, Kencebay M C, Denizaltı T, Derin N, “The effects of sulfite exposure on learning and memory in prenatal and postnatal periods”, An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Volume 12 / Supplement 1 / May, 2018.
- 6) Danişman B, **Akçay G**, Yelli İ, Derin N, “The impact of biotin deficiency on spatial memory in rats”, An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Volume 12 / Supplement 1 / May,2018.
- 7) Saraç Ç, **Akçay G**, Danişman B, Özkan A, Derin N, “Investigation of the Effects of L-Carnitine on Age Related Learning Changes and the Regulation of Glutamate Levels by Behavi Oral presentation and Molecular Methods”, Acta Physiologica, Volume 225, Issue S716, 2018.
- 8) **Akçay G**, Kantar G D, Danişman B, Munzuroğlu M, Kencebay M C, Duman Ö, Derin N, “Investigation of the Effects on Sulfite Exposure on EEG”, Acta Physiologica Volume 225, Issue S716, 2018.
- 9) Bülbül M, Derin N, Sinen O, **Akçay G**, Özkan A, Ağar A, “Effect of Central Exogenous Neuropeptide-S on 6-OHDA-induced Cognitive and Behavi Oral presentation Changes in Rats”, Acta Physiologica, Volume 225, Issue S716, 2018.
- 10) **Akçay G**, Adigüzel D, Çelik Ö Ç, Derin N, “The effect of changing sleep patterns on locomotor activity and anxiety in pregnant mice”, An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, 2017.
- 11) **Akçay G**, Güzel P, Danişman B, Başaranlar G, Derin A T, Derin N, “Effects of Diabetes on Brainstem Auditory Evoked Potentials”, Acta Physiologica, , 218, 87-87. Volume 218, Issue S709, 2016.
- 12) Danişman B, **Akçay G**, Başaranlar G, Kencebay M C, Derin N, “Effects of Ingested Sulfite on Auditory Evoked Brainstem Response”, Acta Physiologica, 218, 87-87. Volume 218, Issue S709, 2016.
- 13) Ertürk E, Gürel T, Lukoyanov AV, **Akçay G**, Eryiğit R, Anisimov VI. “Ab initio study on the rare earth iron pnictides RFeAsO R Pr Nd Sm Gd in the low temperature Cmma phase”, Journal of Physics: Condensed Matter, 2014. 26(4), 45501-87.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1) **Akçay G**, Başaranlar G, Er H, Danişman B, Derin N, Özen Ş, Yargıçoğlu A P, “Cep Telefonlarının İşitsel Beyinsapı Potansiyellerine Etkileri”, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2018.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1) Nemutlu Samur D., **Akçay G.**, Özkan A., Derin N., Ağar A., Özbey G.,” The Effects of Vortioxetine on Motor and Cognitive Dysfunction in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson’s Disease”, Federation of European Neuroscience Societies (FENS), 2020 Virtual Forum, 11-15 July 2020.
- 2) S. Ercan Kelek, E. Afşar, **G. Akçay**, S. Kaya, B. Danışman, M. Aslan,” Effect of l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of aged rats”, 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 19-23 May 2019, Barcelona, Spain. (Poster Presentation)
- 3) **Akçay G**, Danışman B, Saraç Ç, Aslan M, Derin N, “Investigation of the Effects of L-Carnitine on Age-Related Learning Changes and Glutamate Pathway”, FENS Regional Meeting 2019, 10-13 July 2019, Belgrade, Serbia. (Poster Presentation)
- 4) **Akçay G**, Danışman B, Derin N, “Effect of L-Carnitine on age related Learning Changes and the Role of Oxidative Stress in This Effect, 3. Internaional Multidisciplinary Studies Congress, 5-6 October 2018, Kiev, Ukraine.(Oral Presentation)
- 5) Danışman B, Kencebay M C, **Akçay G**, Saraç Ç, Denizaltı T, Aslan M, Derin N, “Effects of sulphite exposure on behaviour and its molecular mechanisms”, 3rd International Multidisciplinary Studies Congress, 5-6 October 2018, Kiev, Ukraine.(Oral Presentation)
- 6) **Akçay G**, Derin N, “Learning and Memory Modulation With Transcranial Direct Current Stimulation”, 1s International Health Sciences and Life Congress, 02-05 May 2018, Burdur, Turkey. (Oral Presentation)
- 7) **Akçay G**, Göksu A K, Tanrıover G, Erin N, Derin N, “Melatonin Used in the Treatment of Breast Cancer Decreases Anxiety”, 1s International Health Sciences and Life Congress, 02-05 May 2018, Burdur, Turkey. (Oral Presentation)
- 8) Keleş Ç N, Şekerci R, **Akçay G**, Ögüt E, “Analysis of locomotor activity in calcaneal tendon therapy”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic. (Poster Presentation)
- 9) Ögüt E, Şekerci R, **Akçay G**, Yıldırım F B, Derin N, “Assessment of Syringic acid and Deltamethrin with learning and memory tests”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS 2018), 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Poster Presentation)
- 10) Tas G G, **Akçay G**, Danışman B, Derin N, Satı G L, Derin A T,” Effect of L-Carnitine Supplementation on Apoptosis in The Cochlea of Aged Rats”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Poster Presentation)
- 11) Göksu A K, **Akçay G**, Erin N, Derin N, Tanrıover G, “The effect of melatonin on locomotor activity with preventive and therapeutic effect in mouse model of breast cancer by behavi Oral presentation and immunohistochemical methods”,

XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Poster Presentation)

- 12) **Akçay G**, Ögüt E, Tas G G, Kıymaz K Z, Yıldırım F B, Derin N, “The Effects of Deltamethrin And Syringic Acid on Brainstem Evoked Auditory Potentials”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Oral Presentation)
- 13) **Akçay G**, Danışman B, Derin N, “Effects of Biotin Deficiency on Learning and Anxiety during Prenatal and Postnatal Periods”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Poster Presentation)
- 14) Ögüt E, Şekerci R, **Akçay G**, Yıldırım F B, Derin N, Satı G L, Aydın A M, “Investigation of possible protective role of syringic acid on hippocampus after chronic deltamethrin exposure”, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic.(Oral Presentation)
- 15) **Akçay G**, Danışman B, Derin N, “Effects of Biotin Deficiency on Learning and Anxiety during Prenatal and Postnatal Periods”, Neuroscience Graduate Summer Workshop with Internaional Participation, 25-27 June 2018, Ankara, Turkey.(Poster Presentation)
- 16) **Akçay G**, Göksu A K, Tanrıöver G, Derin N, “Melatonin Treatment has an Effective Role in Locomotor Activity in Mice Model of Breast Cancer”, 1. International Health Sciences Congress, 23-25 November 2017, Edirne, Turkey.(Oral Presentation)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1) Ayşe Özkan, Mehmet Bülbül, Osman Sinen, Narin Derin, **Güven Akçay**, Mutay Aydın Aslan, Aysel Ağar, “Santral Nöropeptid-S’in Farelerde MPTP ile İndüklenen Davranışsal Değişikliklere Etkisi”, 45.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ekim-3 Kasım 2019, Aydın.(Poster)
- 2) Osman Sinen, Mehmet Bülbül, Ayşe Özkan, Narin Derin, **Güven Akçay**, Hande Parlak, Mutay Aydın Aslan, Aysel Ağar,” Nöropeptid-S’in Deneysel Parkinson Modelinde Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Nöroprotektif Etkisi”, 45.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ekim-3 Kasım 2019, Aydın.(Poster)
- 3) Satı G L, Tas G G, Babacan Ö, Kencebay M C, Danışman B, **Akçay G**, Derin N, “Prenatal, postnatal sülfid maruziyetinin, ratlarda hipokampus glutamat reseptörekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması”, 24. Ulusal Elektronmikroskopi Kongresi (Uluslararası katılımlı), 24-26 Nisan 2019, Edirne.(Poster)
- 4) **Akçay G**, Kencebay M C, Danışman B, Denizaltı T, Saraç Ç, Aydın A M, Derin N, “Sıçanlarda Prenatal ve/veya Postnatal Dönemde Sülfid Maruziyetine Bağlı Nörotoksisitede Glutamatın Rolü”, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 04-07 Nisan 2019, Trabzon. (Sözlü Sunum)
- 5) Saraç Ç, **Akçay G**, Danışman B, Özkan A, Derin N, ”L-Karnitinin Yaşlılığa Bağlı Öğrenme Değişikliklerine ve Glutamat Düzeyinin Regülasyonuna

- Etkilerinin Davranışsal ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması”, 44.Ulusal Fizyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 1-4 Kasım 2018, Antalya. (Sözlü Sunum)
- 6) **Akçay G**, Kantar G D, Danışman B, Munzuroğlu M, Kencebay M C, Denizaltı T, Denizaltı T, Duman Ö, Derin N, “Sülfite Maruziyetinin EEG Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, 44.Ulusal Fizyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 1-4 Kasım 2018, Antalya.(Poster)
 - 7) Bülbül M, Derin N, Sinen O, **Akçay G**, Özkan A, Ağar A, “Sıçanlarda 6-OHDA ile Oluşturulan Bilişsel ve Davranışsal Değişiklikler Üzerine Santral Ekzojen Nöropeptit-S’in Etkisi”, 44.Ulusal Fizyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 1-4 Kasım 2018, Antalya. (Poster)
 - 8) Bektaş N. İ, Adıgüzel D, **Akçay G**, Derin N, Kuşcu N, Çelik Ö. Ç, “Sirkadiyen ritim bozukluğu oluşturulan farelerde görülen uterus içi büyüme geriliği sirkadiyen saat proteinlerinin azalan ekspresyonları ve bozulan endotel disfonksiyonu ile ilişkili olabilir, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya. (Sözlü Sunum)
 - 9) **Akçay G**, Danışman B, Tas G G, Satı G L, Derin N, Derin A T, “Uzun dönem L-karnitin tedavisinin presbiakuzi üzerinde koruyucu etkilerinin araştırılması”, 16.Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.(Sözlü Sunum)
 - 10) **Akçay G**, Danışman B, Kıymaz K. Z, Kencebay M. C, Denizaltı T, Derin N, “Prenatal ve postnatal dönemde sülfite maruziyetinin öğrenme ve hafıza üzerine etkileri”, 16.Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.(Poster)
 - 11) Danışman B, **Akçay G**, Yelli İ, Derin N, “Sıçanlarda biotin eksikliğinin uzaysal hafıza üzerine etkisi”, 16.Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.(Poster)
 - 12) **Akçay G**, Başaranlar G, Er H, Danışman B, Derin N, Özen Ş, Yargıçoğlu A P, “Cep Telefonlarının İşitsel Beyinsapı Potansiyellerine Etkileri, 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi, 6-9 Eylül 2017, İstanbul.(Sözlü)
 - 13) **Akçay G**, Adıgüzel D, Çelik Ö Ç, Derin N, “Gebe Farelerde Değişen Uyku Düzeninin Lokomotor Aktivite ve Anksiyete Üzerine Etkisi”, 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 5-7 Mayıs 2017, Sakarya.(Poster)
 - 14) Danışman B, **Akçay G**, Başaranlar G, Kencebay M C, Derin N, “Diyetle Alınan Sülfite İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyellerine Etkisi”, 42.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Düzce.(Poster)
 - 15) **Akçay G**, Güzel P, Danışman B, Başaranlar G, Derin A T, Derin N, “Diyabetin Uyarılmış Beyinsapı İşitsel Potansiyellerine Etkileri”, 42.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Düzce. (Poster)